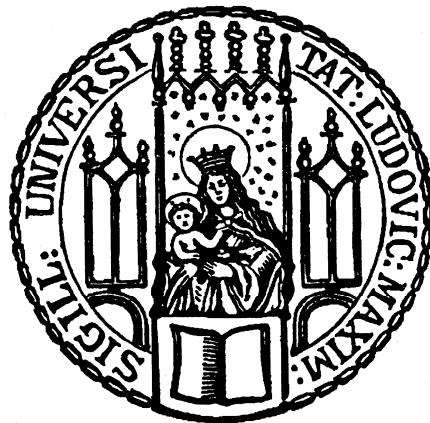


Ludwig-Maximilians-Universität München  
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

# Analyse struktureller Determinanten der toxischen Wirkung amyloider Proteine

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für  
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München



Heidi Olzscha

aus Hamburg

2010

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Absatz 3 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 28.06.2010

Heidi Olzscha

Dissertation eingereicht am: 01.07.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl

2. Gutachter: PD Dr. Konstanze F. Winklhofer

Mündliche Prüfung am: 07.09.2010



## II. Danksagung

Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine stete Betreuung mit unerschöpflichem Ideenreichtum, seine Führung und Lenkung der Experimente in die richtigen Bahnen, sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Durch ihn habe ich eine großartige Förderung erfahren dürfen, insbesondere im Hinblick auf die Teilnahme am Graduiertenprogramm des ENB und des Stipendiums vom FCI.

PD Dr. Konstanze F. Winklhofer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und ihre hilfreichen Hinweise während ihrer Zeit in der Abteilung für Zelluläre Biochemie am MPI.

Dr. R. Martin Vabulas sei für die Ausarbeitung von Projekten sowie für ideelle und technische Hilfestellung gedankt.

Dr. Manajit Hayer-Hartl und Dr. Sonya Schermann danke ich für die Bereitstellung und die Messung im Massenspektrometer, einen Teil der Datenanalyse und hilfreiche Anmerkungen.  
Dr. Stefan Pinkert danke ich für eine weitergehende bioinformatische Analyse der massenspektrometrischen Daten.

Prof. Dr. Dr. Walter Neupert, Prof. Dr. Johannes M. Herrmann und Dr. Kai Hell danke ich für die Betreuung und Koordination im Graduiertenprogramm „Protein Dynamics in Health and Disease“.

Dem FCI danke ich für die Förderung während zweier Jahre der Doktorarbeit.

Bei den Kooperationspartnern Prof. Dr. Michael M. Hecht (Princeton University, USA) Dr. Michele Vendruscolo und Dr. Gian G. Tartaglia in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Dobson (Cambridge University, UK) bedanke ich mich für den Entwurf der *de novo* Proteine, die zur Verfügung gestellten Konstrukte und die *in-silico*-Analysen.

Andreas Wörner danke ich für seine *in vitro*-Arbeiten zu den *de novo* Proteinen und das kritische Lesen der Dissertation und auch Sarah Mikisch danke ich für die Korrektur der Dissertation. Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für ihre kollegiale Hilfe und die nette Arbeitsatmosphäre.

Frau Noëlle Riegel bin ich dankbar für das geborgene und umsorgte Wohnen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung in allen Dingen. Ihnen widme ich diese Arbeit.



### III. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>III</b>
<b>III.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Zusammenfassung .....	1
1.2	Summary .....	3
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
2.1	Proteine im zellbiologischen Kontext .....	5
2.2	Proteinfaltung und Proteinfahlfaltung.....	6
2.3	Molekulare Chaperone .....	9
2.4	Proteinhomöostase (Proteostase).....	12
2.5	Proteinfaltungskrankheiten.....	15
2.5.1	Neurodegenerative Amyloidosen.....	16
2.5.2	Aggregation und Bildung amyloider Strukturen .....	18
2.5.3	Toxische Spezies .....	21
2.5.4	Mögliche Wege zur Zytotoxizität .....	23
2.5.5	Protective Mechanismen .....	26
2.6	Experimentelle Modelle .....	30
2.6.1	<i>De novo</i> generierte amyloide Proteine .....	30
2.6.2	Proteinfaltung durch nicht-kanonische Aminosäuren .....	35
2.6.3	Modifiziertes Huntingtin-Exon 1 als Modellsystem für neurodegenerative Amyloidosen .....	38
2.7	Zielsetzung der Arbeit.....	43
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.1	Material .....	45
3.1.1	Geräte .....	45
3.1.2	Sonstige Geräte/Verbrauchsmaterialien .....	45
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	45
3.1.4	Software .....	45
3.1.5	Spezielle Reagenzien und Testsysteme für molekularbiologische Methoden.....	45
3.1.6	Spezielle Reagenzien und Testsysteme für proteinbiochemische Methoden .....	48
3.1.7	Spezielle Reagenzien und Testsysteme für zellbiologische Methoden .....	51
3.2	Methoden.....	54
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	54
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	58
3.2.3	Zellbiologische Methoden .....	70

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
4.1 <i>De novo</i> generierte amyloide $\beta$ -Faltblattproteine als Modell für Zytotoxizität aggregierender Proteine .....	81
4.1.1 <i>De novo</i> generierte $\beta$ -Faltblattproteine und ihre Modifikationen.....	81
4.1.2 Physiko-chemische Eigenschaften und Homologien der <i>de novo</i> generierten Proteine .....	82
4.1.3 Expression der <i>de novo</i> Proteine in humanen Zellen: Die apparente Molmasse unterscheidet sich von der tatsächlichen in der SDS-PAGE.....	84
4.1.4 <i>De novo</i> $\beta$ -Faltblattproteine aggregieren <i>in vivo</i> .....	86
4.1.5 <i>De novo</i> $\beta$ -Faltblattproteine sind amyloid: Bindung des für amyloide Strukturen spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes NIAD-4 .....	90
4.1.6 <i>De novo</i> amyloide Proteine sind in humanen Zellen zytotoxisch .....	91
4.1.7 <i>De novo</i> amyloide Proteine induzieren Apoptose in humanen Zellen .....	93
4.1.8 <i>De novo</i> amyloide Proteine $\beta$ 4 und $\beta$ 17 zeigen eine andere Verteilung im Saccharose-Gradienten als $\beta$ 23 .....	94
4.1.9 <i>De novo</i> amyloide Proteine zeigen eine zur Zytotoxizität korrelierende A11-Reaktivität .....	95
4.1.10 Die ATP-Konzentration ist in $\beta$ 23 exprimierenden Zellen höher als in Kontrollzellen.....	97
4.1.11 <i>De novo</i> amyloide Proteine colokalisieren nicht mit Mitochondrien, vermindern jedoch ihren Oxidationsstatus .....	98
4.1.12 <i>De novo</i> amyloide Proteine colokalisieren nicht mit F- $\beta$ -Aktin, deformieren jedoch das $\beta$ -Aktin-Zytoskelett .....	99
4.1.13 <i>De novo</i> amyloide Proteine werden nicht proteasomal degradiert und inhibieren das UPS nicht .....	100
4.1.14 Das <i>de novo</i> $\alpha$ -helikale Protein $\alpha$ n86 wird proteasomal degradiert.....	103
4.1.15 Die Proteinbiogenese des Reporterproteins GFP-Luciferase ist in Anwesenheit der <i>de novo</i> amyloiden Proteine supprimiert.....	103
4.1.16 Transient transfizierte GFP-Luc colokalisiert mit den exprimierten <i>de novo</i> amyloiden Proteinen.....	105
4.1.17 Generierung einer stabilen GFP-Luciferase HEK293T-Zelllinie.....	107
4.1.18 Die Expressionslevel stabil exprimierter GFP-Luc sind in Anwesenheit der <i>de novo</i> amyloiden Proteine nicht vermindert.....	108
4.1.19 Stabil exprimierte GFP-Luc colokalisiert mit den exprimierten <i>de novo</i> amyloiden Proteinen.....	109
4.1.20 Die Rückfaltung des stabil exprimierten GFP-Luc wird durch Anwesenheit der <i>de novo</i> amyloiden Proteine partiell inhibiert .....	110
4.1.21 <i>De novo</i> amyloide Proteine supprimieren die Hitzeschockantwort (HSR) .....	112
4.1.22 SILAC in Kombination mit Co-IP und anschliessender Massenspektrometrie .....	117
4.1.23 Detektion des Interaktoms der <i>de novo</i> Proteine mittels SILAC in Kombination mit Co-IP und Massenspektrometrie .....	121
4.1.24 Interaktoren der <i>de novo</i> amyloiden Proteine weisen eine höhere Molmasse, niedrigere Hydrophobizität und mehr IURs als das detektierte Gesamtproteom auf und interagieren ihrerseits vermehrt mit essentiellen Proteinen .....	122
4.1.25 VDAC1 wird nach Co-IP mit <i>de novo</i> amyloiden Proteinen angereichert .....	127
4.1.26 eIF4GII wird nach IP der <i>de novo</i> amyloiden Proteine angereichert und colokalisiert mit ihnen.....	128
4.1.27 Hsp110 wird nach IP der <i>de novo</i> amyloiden Proteine angereichert und colokalisiert mit ihnen.....	129
4.1.28 Präexistentes endogen überexprimiertes Hsp110 kann die Zytotoxizität der <i>de novo</i> Proteine $\beta$ 4 und $\beta$ 17 partiell aufheben.....	131
4.1.29 Überexprimierte Hsp110 verhindert partiell die Aggregatbildung der <i>de novo</i> Proteine $\beta$ 4 und $\beta$ 17 und die pathologische Morphologie der Zellen.....	133

4.1.30	Verminderte Expression von Hsp110 ändert die Zellviabilität der mit <i>de novo</i> amyloiden Proteinen transfizierten Zellen nicht.....	136
4.1.31	Punktmutationen verändern Zytotoxizität und Aggregation der <i>de novo</i> amyloiden Proteine nicht.....	139
4.1.32	Um den letzten β-Strang deletierte oder extendierte <i>de novo</i> amyloide Proteine weisen eine erhöhte Zytotoxizität auf .....	142
4.1.33	Verdoppelte Versionen der <i>de novo</i> amyloiden Proteine zeigen eine intermediäre Zytotoxizität zwischen den verkürzten/extendierten und originalen <i>de novo</i> amyloiden Proteinen .....	145
4.1.34	Die Chimäre aus αS824 und dem letzten β-Strang aus β23 verteilt sich homogen in der Zelle, ist jedoch im Vergleich zu αS824 zytotoxischer .....	147
4.1.35	<i>De novo</i> β-Faltblattproteine mit C4-Tag weisen ähnliche Zytotoxizitäten wie Myc-konjugierte <i>de novo</i> β-Faltblattproteine auf .....	148
4.1.36	Experimentell ermittelte Zytotoxizität der <i>de novo</i> Proteine korreliert mit der <i>in silico</i> prognostizierten Zytotoxizität.....	149
4.2	<b>Das Aminosäureanalogon Azc induziert durch Inkorporation in das Proteom die Bildung zytotoxischer, amyloider Proteinspezies .....</b>	151
4.2.1	Die Zytotoxizität von Azc wird in Gegenwart des proteasomalen Inhibitors MG132 verstärkt .....	151
4.2.2	Azc in Kombination mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 führt zur Bildung amyloider Aggregate in humanen Zellen .....	152
4.2.3	Azc induziert die Bildung präfibrillärer oligomerer Strukturen in humanen Zellen..	153
4.3	<b>Analyse von expandiertem Htt mit fusioniertem CL1-Degron .....</b>	156
4.3.1	Modifikationen des Huntingtin-Exon 1 mit CL1-Degron, Myc-Tag oder HA-Tag...156	
4.3.2	Htt96Q aggregiert stärker als Htt96Q-CL1 .....	157
4.3.3	Htt96Q-CL1 inhibiert das UPS nach 24-stündiger Expression stärker als Htt96Q....158	
4.3.4	Generierung einer stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP .....	160
4.3.5	FACS-Analysen demonstrieren eine Akkumulation des stabil exprimierten Ub-EGFP nach Expression von Htt96Q-CL1 .....	162
4.3.6	Htt96Q-CL1 colokalisiert mit dem Proteasom.....	164
4.3.7	Htt96Q-CL1 induziert den UPR stärker als Htt96Q .....	166
4.3.8	Htt96Q-CL1 ist zytotoxischer als Htt96Q.....	167
4.3.9	Coexprimierte Htt96Q kann die Zytotoxizität von Htt96Q-CL1 verringern .....	167
4.3.10	Aggregate des Htt96Q und Htt96Q-CL1 colokalisieren .....	169
4.3.11	Htt96Q-CL1 wird in SDS-unlösliche Htt96Q-Aggregate rekrutiert .....	170
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>172</b>
5.1	<i>De novo</i> generierte β-Faltblattproteine als Modell für amyloide Proteine.....	173
5.1.1	Physiko-chemische Eigenschaften und Homologien der <i>de novo</i> generierten Proteine .....	173
5.1.2	Expression der <i>de novo</i> generierten Proteine in humanen Zellen .....	174
5.1.3	<i>De novo</i> β-Faltblattproteine bilden amyloide Aggregate und präfibrilläre Oligomere in humanen Zellen.....	176
5.1.4	<i>De novo</i> amyloide Proteine sind zytotoxisch und induzieren Apoptose .....	179
5.1.5	<i>De novo</i> amyloide Proteine ändern die zelluläre Morphologie und das Aktinzytoskelett .....	182
5.1.6	<i>De novo</i> amyloide Proteine supprimieren die Proteinbiogenese .....	183
5.1.7	<i>De novo</i> amyloide Proteine interagieren mit labilen Proteinen wie der GFP-Luciferase und können deren Rückfaltung inhibieren .....	185
5.1.8	<i>De novo</i> amyloide Proteine supprimieren die Hitzeschockantwort (HSR) .....	187
5.1.9	<i>De novo</i> amyloide Proteine interagieren mit einem essentiellen metastabilen Subproteom und induzieren multifaktorielle Zytotoxizität .....	188

5.1.10	Verifizierung ausgewählter Interaktoren der <i>de novo</i> Proteine mit biochemischen und zellbiologischen Methoden.....	192
5.1.11	Überexpression von Hsp110 kann die Zytotoxizität der <i>de novo</i> amyloiden Proteine $\beta$ 4 und $\beta$ 17, sowie partiell die Bildung ihrer Aggregat, vermindern ....	194
5.1.12	Modell der durch die <i>de novo</i> amyloiden Proteine vermittelte Zytotoxizität.....	197
5.1.13	Konversion der semitoxischen <i>de novo</i> amyloiden Proteine durch Extension oder Deletion eines $\beta$ -Stranges in toxische <i>de novo</i> amyloide Proteine.....	199
5.2	Das Aminosäure-Analogon Azc ist zytotoxisch und generiert amyloide Fehlfaltung endogener Proteine .....	204
5.3	Lösliche amyloide Proteine sind zytotoxischer als Aggregate: Htt96Q-CL1 vs. Htt96Q unterstützen diese Hypothese .....	208
5.4	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verschiedenen untersuchten amyloiden Proteine.....	216
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>218</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>240</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>245</b>
8.1	Anhang A: Geräteliste .....	245
8.2	Anhang B: Sonstige Geräte/Verbrauchsmaterialien .....	246
8.3	Anhang C: Chemikalien und Reagenzien .....	248
8.4	Anhang D: Oligonukleotide und klonierte Konstrukte .....	250
8.5	Anhang E: Antikörper .....	253
8.6	Anhang F: Übersicht über die Aminosäuresequenzen der <i>de novo</i> Proteine und ihrer modifizierten Konstrukte .....	255
8.7	Anhang G: Interaktorenlisten der <i>de novo</i> Proteine .....	255
<b>9.</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>260</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>261</b>

## 1. Zusammenfassung

### 1.1 Zusammenfassung

Ein lebender Organismus ist unter anderem durch seine Fähigkeit zum präzisen Auf- und Zusammenbau höherer molekularer Strukturen charakterisiert, wobei die Faltung und Assemblierung von Proteinen eine bedeutende Rolle spielt. Die Proteinfaltung wird durch molekulare Chaperone unterstützt und optimiert, bis ein Protein seine native, biologisch funktionelle Struktur eingenommen hat. Durch exogene Einflüsse oder endogene Veränderungen eines Proteins, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie *M. Alzheimer*, *M. Parkinson* oder *Chorea Huntington*, oder des gesamten Proteinnetzwerkes, kann Proteinfaltungsfehlung, Aggregation und die Ausbildung amyloider Strukturen, verbunden mit Zytotoxizität, auftreten.

Die zur Fehlfaltung und Bildung ähnlicher amyloider Aggregate führenden strukturellen Determinanten der Zytotoxizität, verursacht durch Proteine unterschiedlicher Primärstruktur und Länge, sind nur unzureichend erforscht. Eine Hypothese besagt, dass lösliche intermediäre Oligomere der aggregierenden Proteine die toxische Spezies in einem wahrscheinlich multifunktionellen pathogenen Geschehen darstellen. Es gibt Hinweise, dass eine zusammenbrechende Proteostase verbunden mit einer zu geringeren Kapazität molekulärer Chaperone zu den deletären Effekten führt. Auch ist nicht abschließend geklärt, ob und zu welchem Anteil die Toxizität durch Aggregation des Proteins und damit verbundener erhöhter Pathogenität bedingt ist, oder inwieweit durch einen Funktionsverlust des fehlgefalteten Proteins selbst.

Um zytotoxische Effekte in humanen Zellen zu analysieren, wurden *de novo* generierte  $\beta$ -Faltblattproteine untersucht, welche durch Aggregation in der Zelle keine Autofunktionsstörung auslösen sollten. Es wurde gezeigt, dass diese artifiziellen Proteine in HEK293T-Zellen amyloide Aggregate bildeten und zytotoxisch wirkten, im Vergleich zu *de novo* generierten  $\alpha$ -helikalen Proteinen, welche löslich und homogen in der Zelle verteilt vorlagen und nahezu keine Zytotoxizität aufwiesen. Drei aus einer kombinatorischen Bibliothek ausgewählte *de novo* amyloide Proteine,  $\beta4$ ,  $\beta17$  und  $\beta23$ , waren zytotoxisch mit der Gradierung  $\beta4 < \beta17 < \beta23$ , sie induzierten Apoptose und veränderten die Zellmorphologie. Die Zytotoxizität korrelierte mit vorhandenen präfibrillären, intermediären Oligomeren. Die Proteine beeinträchtigten die Rückfaltung von GFP-Luciferase in gleicher

Abstufung, ebenso eine Induktion der Stressantwort und die Proteinbiogenese. Die Aggregate colokalisierten mit GFP-Luciferase, jedoch nicht mit GFP. Eine massenspektrometrische Untersuchung der Interaktionspartner der drei *de novo* amyloiden Proteine in Kombination mit SILAC und Co-IP wies Interaktionen mit metastabilen Proteinen essentieller zellulärer Funktionen nach, dabei wurde Hsp110 als stark angereichertes Chaperon unter den Interaktoren identifiziert. Eine Überexpression von Hsp110 verminderte die Zytotoxizität der *de novo* Proteine  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17, jedoch nicht  $\beta$ 23. Hsp110 war ebenfalls in der Lage, Aggregate teilweise zu solubilisieren und eine normalisierte Zellmorphologie wieder herzustellen. Um einen  $\beta$ -Strang verkürzte oder verlängerte Mutanten der semitoxischen  $\beta$ -Faltblattproteine  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 wiesen eine erhöhte Zytotoxizität auf, so dass wahrscheinlich generell  $\beta$ -Faltblattproteine mit einer ungeraden Anzahl an  $\beta$ -Strängen toxischer sind als ihre Derivate mit gerader Anzahl an  $\beta$ -Strängen, da ungepaarte reaktive  $\beta$ -Stränge vorliegen dürften. Zusammenfassend stellen die *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine ein attraktives Modell dar, um aggregierende, amyloide Proteine ohne biologische Funktion *in vivo* zu untersuchen.

Inkubation humaner Zellen mit dem Prolin-Analogon Azetidin-2-carbonsäure führte in Anwesenheit eines proteasomalen Inhibitors zur Verstärkung der Zytotoxizität, es entstanden amyloide Aggregate und präfibrilläre Intermediate, so dass die Hypothese der Verstärkung von Funktion und Pathogenität durch Aggregation in diesem System weiter untermauert wurde.

Expression von Huntingtin mit expandierter PolyQ-Sequenz und einem angefügten hydrophoben CL1-Degron führte zu einer Erhöhung der Löslichkeit, zu verstärkter Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems und zu erhöhter Zytotoxizität im Vergleich zu expandiertem Huntingtin ohne CL1-Degron. Die Zytotoxizität des mit Degron versehenen Huntingtins konnte mittels Überexpression von expandiertem Huntingtin ohne Degron durch Coaggregation verringert werden.

Die Ergebnisse sprechen für die Hypothesen, dass präfibrilläre Intermediate die maßgeblichen zytotoxischen Spezies darstellen, während große Aggregate eine protektive Funktion einnehmen können. Eine Überexpression fehlfaltender Proteine kann in multifaktorieller Weise zur Interaktion mit essentiellen zellulären Proteinen führen und die Funktion metastabiler Proteine beeinträchtigen, was u.a. im Falle der *de novo* amyloiden Proteine zur Inhibition der Proteinbiogenese und der HSR führt. Akkumulation endogener fehlgefalteter Proteine durch proteasomale Inhibition legt den Mechanismus einer Verstärkung der Zytotoxizität durch amyloide, aggregierende Proteine *per se* nahe.

## 1.2 Summary

A living organism is characterized by its ability to build and assemble higher molecular structures, whereby the folding and assembly of proteins plays a pivotal role. Molecular chaperones assist and optimize protein folding, until a protein reaches its native, biologically active structure. Exogenous influences or endogenous alterations of a protein, mutated proteins in neurodegenerative diseases, for example in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, or Huntington's disease, or of the whole proteome network, can promote protein misfolding, aggregation, and the formation of amyloid structures, corresponding to cytotoxicity. The structural determinants of cytotoxicity, connected to protein misfolding and formation of similar amyloid aggregates by proteins of different sequence and length, are not entirely characterized. One hypothesis claims that soluble, intermediate oligomers of the aggregation-prone proteins represent the toxic species in a presumably multi-factorial pathogenic process. There is evidence that a collapsed proteostasis network due to interaction of the toxic species with essential cellular components, combined with a low molecular chaperone capacity in the cells, leads to the deleterious effects. Also, it is unclear whether and to what extent the observed cytotoxicity in amyloidoses is based on a gain or loss of function of the respective misfolded proteins.

In order to analyze the cytotoxic effects in human cells, three *de novo* designed  $\beta$ -sheet proteins were analyzed –  $\beta$ 4,  $\beta$ 17, and  $\beta$ 23 – without any biological function, which implies that there will only be a gain of function, no loss of function. In the present study, it was demonstrated that these *de novo*  $\beta$ -sheet proteins form amyloid aggregates and are cytotoxic in human cells, in contrast to *de novo* designed  $\alpha$ -helical proteins which are soluble and homogenously distributed in the cells, and do not exhibit a comparable cytotoxicity. Expression of the three  $\beta$ -proteins in HEK293T cells resulted in increased cytotoxicity with the gradation  $\beta$ 4 <  $\beta$ 17 <  $\beta$ 23, induced apoptosis, and altered cell morphology. The gradation of the cytotoxicity correlated with the existence of prefibrillar intermediate oligomers. These artificial amyloid proteins inhibited, in the same gradation, the refolding of GFP-luciferase, the induction of the HSR, and protein biogenesis. Their aggregates colocalized with GFP-luciferase, but not with GFP. SILAC applied in combination with Co-IP followed by mass spectrometry revealed that the interaction partners of the *de novo* amyloid proteins are metastable proteins with essential cellular functions. Hsp110 was identified as a strongly enriched interaction partner of the *de novo* proteins. Overexpression of Hsp110 diminished

the cytotoxicity of the *de novo* proteins  $\beta$ 4 and  $\beta$ 17, but not  $\beta$ 23. Furthermore, Hsp110 was able to keep the *de novo* proteins soluble to a certain extent and to maintain the cells in their normal shape. Deletion or extension of one  $\beta$ -strand of the *de novo* semitoxic  $\beta$ -sheet proteins  $\beta$ 4 or  $\beta$ 17 resulted in an increased cytotoxicity, suggesting that  $\beta$ -sheet proteins with an odd number of  $\beta$ -strands are more cytotoxic than their derivatives with an even number. In summary, the *de novo* designed  $\beta$ -sheet proteins represent an attractive model of aggregating proteins to investigate amyloid proteins without any biological function *in vivo*.

Closely related to the question of whether a gain of function is important in the cytotoxicity of misfolding proteins, an administration of the proline-analog azetidine-2-carboxylic acid in combination with a proteasomal inhibitor led to a gain of cytotoxicity in human cells. Also, under these conditions, amyloidal aggregates and prefibrillar intermediate oligomers appeared.

Huntingtin with an expanded polyQ-sequence and an additional hydrophobic CL1-Degron led to a stronger inhibition of the ubiquitin-proteasome system, displayed lower cell viability, and was more soluble compared to the expanded Huntingtin without degron. It was possible to reduce the cytotoxicity in the human cellular system by a high overexpression of the non-toxic version of expanded Huntingtin without degron by coaggregation and trapping of the toxic species.

These results support the hypotheses that aggregation and formation of aggregates plays a protective role, whereas intermediates are cytotoxic species; overexpression of misfolding proteins perturbs the folding of metastable proteins and interferes in a multi-factorial manner with essential cellular proteins, also resulting in the observed inhibition of protein biogenesis and the HSR. The accumulation of misfolded proteins after inhibition of the proteasome supports the hypothesis that gain of function plays an important role in the cytotoxic events of amyloid aggregation.

## 2. Einleitung

### 2.1 Proteine im zellbiologischen Kontext

Zellen (Hooke, 1665), die elementaren Einheiten aller lebenden Organismen, sind hauptsächlich aus den vier makromolekularen Verbindungsklassen der Proteine, Desoxyribonukleinsäure (DNS), Kohlenhydrate und Fette aufgebaut. Unter diesen stellen Proteine die häufigste Verbindungsklasse dar, was sich bereits in ihrem Namen widerspiegelt. Der Name „Protein“ wurde 1838 von Jøns Jacob Berzelius in einem Brief an Gerhardus Johannes Mulder erstmalig erwähnt und im folgenden Jahr von diesem publiziert (Mulder, 1839). Der Name ist abgeleitet vom griechischen  $\pi\varphi\omega\tau\epsilon\iota\circ\varsigma$  = erstrangig, an erster Stelle stehend, von herausragender Bedeutung. Denn Proteine üben in der Zelle, aber auch interzellulär, vielfältige Funktionen aus: Als Katalysatoren, Strukturproteine, Transporter, Signalmoleküle und Rezeptoren, als Abwehrmoleküle, und schließlich helfen sie bei der Faltung der Proteine selbst.

Die biologische Funktion der Proteine ist durch ihre Struktur determiniert, und diese wiederum durch die lineare Abfolge der 20 (manchmal als 21 mit Selenocystein und 22 mit Pyrolysin bezeichneten) kanonischen oder proteinogenen Aminosäuren (As). Die Proteinstruktur lässt sich durch verschiedene Ebenen beschreiben, mit der Primärstruktur als lineare Abfolge der einzelnen As im Protein, ausgehend vom aminoterminalen (N-terminalen) zum carboxyterminalen (C-terminalen) Ende des Proteins. Die Sekundärstruktur eines Proteins beschreibt besonders häufig wiederkehrenden Strukturmotive für die sterische Anordnung der Aminosäuren, hierzu gehören die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -Schleifen und ungeordnete (Random-Coil-) Strukturen. Übergeordnete räumliche Strukturen werden als Domänen bezeichnet, aus diesen setzt sich schließlich die Tertiärstruktur des Proteins zusammen. Sie wird als nativ oder als native Konformation bezeichnet, wenn das Protein in dieser Struktur seine biologische Funktion ausüben kann und ist in vielen Fällen die thermodynamisch günstigste. Für die Sekundärstrukturen sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den As-Resten ausschlaggebend, während für die Tertiärstruktur vermehrt ionische Bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und kovalent verknüpfte Cysteine (Cystinbrücken) eine Rolle spielen. Lagern sich Proteine zu einem supramolekularen Komplex zusammen, so wird dies als Quartärstruktur bezeichnet. Häufig wird ein Protein erst dann als Protein bezeichnet, wenn es eine distinkte räumliche Gestalt annehmen kann, sonst als Polypeptid. Proteine werden auch nach ihrer räumlichen Gestalt als globuläre Proteine (Tertiärstruktur kugelförmig, in wässriger

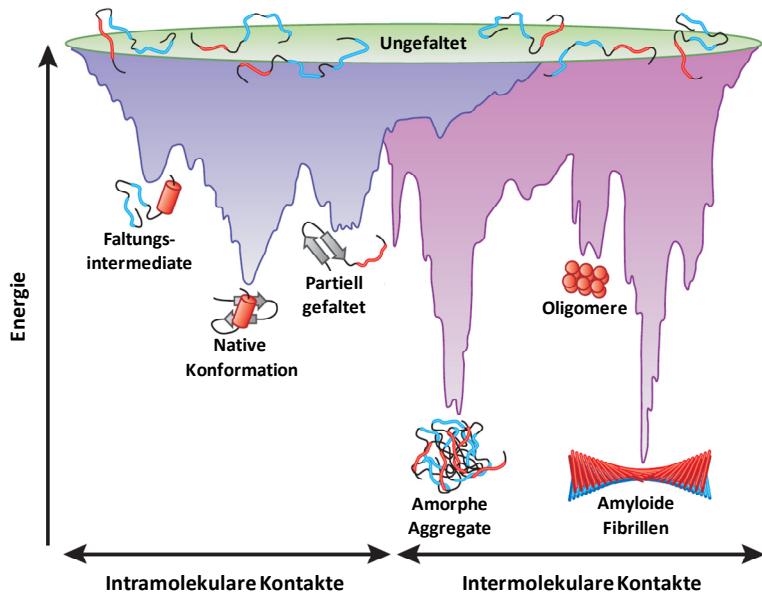
Umgebung löslich) oder fibrilläre Proteine (Tertiärstruktur fadenförmig, häufig in wässriger Umgebung unlöslich) bezeichnet.

Die den Proteinen immanente Information der Primärstruktur bedingt jegliche andere Struktur und Konformation in zellulärem Milieu und damit ebenfalls ihre biologische Funktion. Daher ist der Prozess der korrekten Faltung der Proteine essentiell für jede zelluläre Funktion und somit den gesamten Organismus.

## 2.2 Proteinfaltung und -fehlfaltung

Die Faltung eines Proteins ist ein komplexer Prozess, welcher abhängig von der Aminosäuresequenz und von der Länge des Proteins bzw. seiner Domänen ist. Christian Anfinsen zeigte 1954 erstmals den Zusammenhang zwischen Aminosäuresequenz und sterischer Struktur eines Proteins am Beispiel der Ribonuklease, und 1961, dass Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen durch deren Primärstruktur determiniert sind (Anfinsen et al., 1954, Anfinsen und Haber, 1961, Anfinsen, 1973). Die nativen Konformationen von Proteinen korrelieren meistens mit denjenigen Strukturen, die unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch am stabilsten sind (Dobson et al., 1998). Dennoch ist die absolute Zahl möglicher Konformationen eines gegebenen Proteins so hoch, dass ein systematisches Probieren aller Strukturen eine sehr lange Zeit in Anspruch nehmen würde, ein Modell, das als Levinthal Paradoxon widerlegt wurde (Levinthal, 1969). Man geht heute davon aus, dass der Faltungsprozess keine obligatorischen Schritte zwischen bestimmten partiell gefalteten Konformeren beinhaltet, wobei strukturelle Faltungseinheiten im Protein die Möglichkeiten bereits einschränken (Dobson et al., 1998; Wolynes et al., 1995; Dill und Chan, 1997). Die eine ungefaltete oder nur partiell gefaltete Polypeptidkette begleitenden Fluktuationen ihrer Konformation lassen auch Aminosäurereste aus linear weiter entfernten Abschnitten des Proteins sich einander nähern und Kontakte herstellen. Normalerweise sind nativ-ähnliche Interaktionen zwischen bestimmten As thermodynamisch stabiler als nicht-native Kontakte, sie halten länger, fluktuieren daher weniger, und dies ermöglicht es der Polypeptidkette, die energetisch niedrigste Struktur einzunehmen. Wenn die sogenannte Energielandschaft eine entsprechende trichterförmige Struktur besitzt, dann sollten nur wenige aller möglichen Konformationen durchlaufen werden, um von einer ungefalteten Struktur die Transition zur nativen Struktur zu durchlaufen (Dinner et al., 2000). Ausgehend von einer höheren energetischen Stufe nehmen ungefaltete Proteine über eine Reihe von Zwischenstufen oder Intermediate unter normalen physiologischen Bedingungen eines

Durchschnittsproteins (nicht mutiert) die native, energetisch niedrigste Struktur ein (s. Abb. 2.1), wobei die Energielandschaft eines solchen Faltungsprozesses als ein unregelmäßiger Trichter beschrieben werden kann (Schultz 2000; Jahn und Radford, 2005). Der hydrophobe Effekt wird als treibende Kraft hinter der Proteinfaltung angesehen, wobei eine wässrige physiologische Umgebung hydrophobe As forciert, eine kompakte Struktur im Inneren eines Proteins einzunehmen.



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Energielandschaft bei Proteinfaltung und -fehlfaltung.** Die violett gehaltene Oberfläche stellt die verschiedenen Wege eines ungefalteten Proteins (hohe Energie) zum nativen Protein (niedrige Energie) dar. Bei der Faltung können Faltungsintermediate und partiell gefaltete Proteine auftreten, welche verschiedene energetische Zustände einnehmen können. Stabilere Intermediate werden häufig in lokalen energetischen Minima gehalten. Die pink gehaltene Oberfläche repräsentiert Konformationen, welche von der ungefalteten Form in amorphe Aggregate oder amyloide Fibrillen durch intermolekulare Interaktionen übergehen kann. Diese im absoluten

energetischen Minimum gehaltenen stabilen abnorm gefalteten Proteine können die native Konformation nicht mehr erreichen. Wahrscheinlich zytotoxische Oligomere werden in einer unproduktiven Reaktion bei der Entstehung amyloider Spezies gebildet (modifiziert nach Hartl und Hayer-Hartl, 2009).

Am Anfang initiieren räumlich benachbarte Aminosäuresequenzen die Faltung und bilden vermutlich einen intramolekularen Faltungskeim, wobei dann die Bildung der transienten, partiell gefalteten und kompakteren Intermediate schneller vorstatten geht. Diese Intermediate sind die Regel für Proteine mit mehr als 100 As, es wurde jedoch nachgewiesen, dass auch kleinere Proteine über Intermediate falten (Brockwell und Radford, 2007). Solch ein Intermediat kann ein sogenanntes „Molten Globule“ darstellen; es besitzt zwar bereits viele Sekundärstrukturelemente, aber es fehlt die globale Tertiärstruktur des Proteins (Ohgushi und Wada, 1983). Größere Elementarzellen während der Faltung in immer wiederkehrenden Motiven werden auch als Foldons bezeichnet (Lindberg und Oliveberg, 2007), zu denen beispielsweise zweisträngige Helix-Motive in  $\alpha/\beta$ -Domänen zählen. Je länger und komplexer ein Protein konstituiert ist, insbesondere wenn mehrere Domänen während der Faltung unproduktive Wechselwirkungen im Hinblick auf die Erreichbarkeit des nativen Status eingehen können, desto mehr kann dies zu Fehlfaltungen des Proteins oder

einzelner Domänen führen mit der Konsequenz einer eventuellen Aggregation (Netzer und Hartl, 1997; Wright et al., 2005).

Während unter *in vitro*-Bedingungen kleine und einfach strukturierte Proteine spontan falten, entfalten und zurückfalten können, sind die Verhältnisse unter *in vivo*-Bedingungen ungleich schwieriger und es werden mehr Faltungen und Faltungswege beobachtet (Dobson, 2003). Denn anders als unter *in vitro*-Bedingungen hängt die Faltung von Proteinen hier nicht nur von physiko-chemischen Parametern wie pH-Wert, Temperatur oder Salzkonzentration ab, sondern auch von der dichten Packung anderer Biomoleküle, insbesondere Proteine, welche 20 % bis 30 % des gesamten Zellvolumens ausmachen können. Dieses Volumen in der Zelle steht nicht für biochemische Reaktionen zur Verfügung, daher wird dieser Effekt als molekulare Verdrängung oder als exkludierter Volumeneffekt bezeichnet (Ellis, 2001). Weniger Volumen in den Zellen führt für die Proteine zu einer eingeschränkten Bewegungsfreiheit (weniger Freiheitsgrade) und es können vermehrt intra- und intermolekulare Interaktionen auftreten, so dass es in einem mit anderen Komponenten überladenen zellulären Milieu zu Fehlfaltungen und Aggregationen kommen kann. Erschwerend kommt im zellulären Systemen die Translation als ein Prozess bei der Proteinfaltung hinzu, denn die langsam (ca. 15 – 74 s für ein Protein mit 300 As) naszierende Polypeptidkette kann noch nicht in ihre komplette Tertiärstruktur falten, solange das Protein nicht vollständig synthetisiert und aus dem Ribosom entlassen wurde, so dass nur die Faltung einiger Sekundärstrukturelemente ermöglicht wird (Lu und Deutsch, 2005; Etchells und Hartl, 2004). Naszierende Polypeptidketten exponieren hydrophobe As-Reste, welche im nativen Protein im Inneren verborgen sind und seinen Kern bilden, so dass es durch hydrophobe Wechselwirkungen zu intra- und auch intermolekularer Fehlfaltung und damit Aggregation kommen kann. Nicht nur die *de novo*- Synthese führt zu partiell gefalteten Proteinen. Exogene (pH, thermischer Stress) oder endogene (spezifische Mutationen, chemische Modifikationen durch z.B. reaktive Sauerstoffspezies, ROS) Faktoren können zur Fehlfaltung in nicht-native Strukturen beitragen, so dass in höherem Maße hydrophobe Sequenzen exponiert werden, was ebenfalls zur Aggregation führt (Stefani und Dobson, 2003). Häufig führt der Prozess der Aggregation zur Bildung von amorphen Strukturen (s. auch Abb. 2.1), sie kann jedoch auch in der Formierung von hochgeordneten Strukturen, den fibrillären Aggregaten, gipfeln. In speziellen Fällen nehmen diese fibrillären Aggregate eine amyloide Form an, welche durch eine distinkte Kreuz- $\beta$ -Struktur in der Röntgenstrukturanalyse, die Anfärbbarkeit mit bestimmten Farbstoffen, eine typische fibrilläre Morphologie in elektronenmikroskopischen Analysen und bemerkenswerte Stabilität gegenüber Degradation gekennzeichnet ist (Dobson,

2003; Lansbury, 1999; Sunde und Blake, 1998). Bei vielen Amyloidosen (s. auch Amyloidosen 2.5) werden wegen mutierter Gene bestimmte amyloide Strukturen der entsprechenden Proteine gebildet.

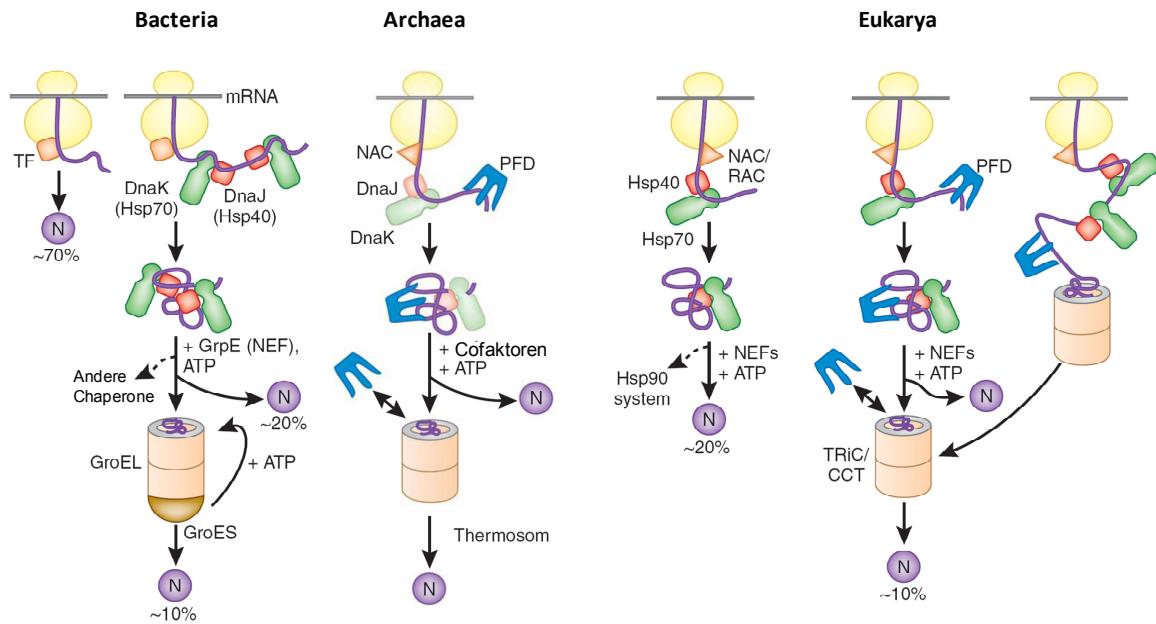
Auf Grund der beschriebenen Probleme bei der *in vivo*-Proteinfaltung haben Organismen viele Strategien entwickelt, wie sie den deletären Einflüssen fehlgefalteter Proteine begegnen können, wobei die molekularen Chaperone die erste und wichtigste Verteidigungslinie gegen Fehlfaltung und Aggregation darstellen.

## 2.3 Molekulare Chaperone

Die Bezeichnung „molekulares Chaperon“ (Chaperon frz. Anstandsdame) wurde zum erstenmal von Ron Laskey 1978 im biochemischen Kontext benutzt, wobei hier die Fähigkeit von Nukleoplasmin beschrieben wurde, die Aggregation von gefalteten Histonproteinen mit DNS während der Assemblierung von Nukleosomen zu verhindern. Diese Bezeichnung wurde 1987 auf Proteine ausgedehnt, welche die korrekte Faltung und Assemblierung von Proteinen unterstützen (Ellis, 1987). Es wurde dann realisiert, dass ähnliche Proteine Faltungs- und Assemblierungsprozesse sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten unterstützen (Hemmingsen et al., 1988; Cheng et al., 1989), wobei eine ATP-abhängige Proteinfaltung demonstriert wurde (Goloubinoff et al., 1989; Ostermann et al., 1989).

Ein Protein wird als molekulares Chaperon definiert, wenn es mit nicht-nativen Proteinen interagieren kann, sie stabilisiert oder hilft, ihre native Konformation einzunehmen, jedoch in der endgültigen Struktur nicht enthalten ist (Hartl und Hayer-Hartl, 2009). Molekulare Chaperone sind abzugrenzen von den chemischen Chaperonen, bei welchen es sich um natürliche oder synthetische kleine nicht-proteinogene Moleküle handelt, welche ebenfalls die Faltung von Proteinen begünstigen können, ohne Teil ihrer nativen Struktur zu werden. Wichtig ist ebenfalls, dass Chaperone keine spezifischen sterischen Informationen für die Faltung der jeweiligen Proteine beinhalten, sondern unproduktive Interaktionen inhibieren und es auf diese Weise dem Protein erlauben, mit höherer Effizienz in seine native Struktur zu falten. Sie sind damit von sogenannten Faltungskatalysatoren abzugrenzen, welche wie die Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerasen oder Proteindisulfidisomerasen kovalente Bindungen katalysieren (Lang und Schmidt, 1988). Bei hohen Temperaturen oder in Anwesenheit verschiedener Chemikalien können Proteine instabil werden und zur Fehlfaltung tendieren. Die Zelle begegnet dieser Bedrohung, indem sie die Menge an protektiven Proteinen erhöht, ein Phänomen, welches als Hitzeschockantwort (HSR) oder Stressantwort bezeichnet wurde

(Ellis, 1987). Viele dieser induzierten Hitzeschockproteine (Hsps) wurden als molekulare Chaperone identifiziert.



**Abb. 2.2: Übersicht über Proteinfaltung im Zytosapton mit Hilfe molekularer Chaperone.** Naszierende Polypeptidketten in Bakterien interagieren mit dem Chaperon Triggerfaktor (TF) und ca. 70 % aller bakteriellen kleineren Proteine falten schnell in ihre native Struktur ohne weitere Hilfe. Längere Polypeptidketten können nachfolgend mit DnaK und DnaJ (dem Hsp70-System) interagieren, während nur 10 % aller Polypeptidketten durch das Chaperoninsystem GroEL und GroES (essential for growth, große (large) und kleine (small) Untereinheit), in ihre native Form (N) überführt werden. Auch in Archaea können die naszierenden Ketten direkt mit Chaperonen, z.B. NAC (nascent chain-associated complex) oder PFD (Prefoldin) interagieren, jedoch auch in einigen Fällen mit Chaperonen des Hsp70-Systems. Das zu den Chaperoninen gehörende Thermosom in Archaea kann posttranslational die Faltung einiger Proteine begünstigen. In eukaryotischen Zellen kann NAC, ähnlich wie TF in bakteriellen Systemen, an die naszierende Polypeptidkette binden. In etwa 20 % aller eukaryotischen Proteine geschieht die Transition in ihre native Form auch mit Hilfe von RAC (Ribosom-assozierter Komplex), Hsp70 und Hsp40; ein Teil dieser Proteine benötigt Hsp90 für die korrekte Faltung. Ca. 10 % der Polypeptidketten werden co- oder posttranslational dem Chaperonin TRiC/CCT über Hsp70 und PFD zugeführt, welche beide direkt mit TRiC/CCT interagieren können (modifiziert nach Hartl und Hayer-Hartl, 2009).

Molekulare Chaperone helfen bei der Faltung der Proteine, verhindern ihre Fehlfaltung und Aggregation, leiten bestimmte fehlgefaltete Proteine zur Degradationsmaschinerie und können auch in einigen Fällen denaturierte oder aggregierte Proteine solubilisieren. In eukaryotischen Organismen wird die Expression der molekularen Chaperone durch Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSFs) induziert, wobei sie an sogenannte HSEs (heat shock response elements) binden, welche die Expression der Chaperone regulieren (Shamovsky und Nudler, 2008). Die Fähigkeit zur Induktion von molekularen Chaperonen nimmt in Eukaryoten während des Alters ab – ein Hinweis darauf, warum einige Amyloidosen erst mit höherem Alter manifest werden (Hinault et al., 2006).

Molekulare Chaperone unterstützen in vielen zellulären Kompartimenten die Proteinfaltung, einschließlich im Zytosapton, im Nukleus, dem ER und in Mitochondrien,

wobei sie nicht nur für eine co- und posttranskriptionale Proteinfaltung sorgen, sondern auch für eine Entfaltung und Rückfaltung von Proteinen, welche zelluläre Kompartimente wechseln, für eine Assemblierung oligomerer Komplexe oder für eine Bindung anderer Proteine (Hormone) an genetische Sequenzen (Cheng et al., 1989; Ostermann et al., 1989; Vembar und Brodsky, 2008).

Die meisten Chaperone gehören einer der fünf Hsp-Familien an: Die kleinen Hsps, welche keine intrinsische ATPase-Aktivität aufweisen, und die ATPase-Familien Hsp60, Hsp70, Hsp90 und Hsp100. Abb. 2.2 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen molekularen Chaperone mit ihren diversen Funktionen in den verschiedenen Domänen des Lebens. Die Ribosomen-gebundenen Chaperone sind die ersten, welche mit den naszierenden Polypeptidketten in Berührung kommen. In Bakterien ist dies TF, ein ATP-unabhängiges Chaperon, das hydrophobe Bereiche der wachsenden Kette abschirmt und diese löslich hält (Kaiser et al., 2006; Lakshmiapthy et al., 2007). In eukaryotischen Organismen übernimmt RAC ähnliche Aufgaben (Hundley et al., 2005), NAC ist in Archaea und Eukarya präsent (Wegrzyn et al., 2006), ein Heterodimer, welches ebenfalls die naszierende Polypeptidkette bindet.

Insbesondere längere eukaryotische Proteine mit mehreren Domänen werden mit Hilfe des Hsp70/Hsp40-Systems gefaltet. In Bakterien ist dies DnaK mit DnaJ als kooperierendem Cochaperon mit J-Domäne, in Eukaryoten verschiedene Hsp70-Proteine, welche induziert (Hsp70) oder konstitutiv aktiv vorliegen (Hsc70) mit ihren Hsp40 Cochaperonen. Weiter benötigen diese ATP-abhängigen Chaperone Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs), um Zyklen von Bindung und Freisetzung faltender Proteine schnell zu gewährleisten.

Ein Beispiel für einen solchen NEF in mammalischen Zellen ist Hsp110 (Dragovic et al., 2006; Raviol et al., 2006; Polier et al., 2008), wobei gezeigt wurde, dass Hsp110 auch als Holdase fungieren (Oh et al., 1997; Oh et al., 1999; Goeckeler et al., 2002) und direkt die Proteinaggregation verhindern kann (Ishihara et al., 2003).

Die Hsp70-Chaperone und ihre Cochaperone binden nicht direkt an das Ribosom, können jedoch die Faltung der Polypeptidketten co- und posttranskriptional unterstützen. Bei einer cotranskriptionalen Faltung von Domänen werden nicht-native Kontakte zwischen diesen durch die Chaperone verhindert, so dass lokale Minima in der Faltungslandschaft vermieden werden (Netzer und Hartl, 1997; Agashe et al., 2004). Ca. 10 % bis 20 % der naszierenden Polypeptidketten können mittels Hsp70/Hsp40-Systems ihre native Struktur erhalten, andere langsam faltende Proteine werden nachfolgend mit Hilfe des zentralen Hsp70/Hsp40-Systems an Hsp90 (Wandinger et al., 2008) oder an die zylindrischen Chaperonine

weitergeleitet, insbesondere an GroEL/GroES in Bakterien, das Thermosom in Archaea oder TRiC/CCT in Eukarya (Cuéllar et al., 2008; Thulasiraman et al., 1999).

GroEL/GroES in Bakterien schließt Substrate bevorzugt mit  $\alpha/\beta$ - und  $\alpha+\beta$ -Topologie als große zylindrische Komplexe physikalisch ein, so dass diese in einer von anderen Molekülen unbeeinträchtigten Umgebung zu ihrer nativen Struktur in ATP-abhängigen Zyklen gefaltet werden (Kerner et al., 2005; Sharma et al., 2008). In Eukaryoten werden die naszierenden Ketten bestimmter Proteine, z.B. Aktin oder Tubulin, von PFD gebunden, welches die noch nicht-nativen Proteine dann an TRiC/CCT weiterleitet (Vainberg et al., 1998). Andere Proteine, insbesondere Kinasen und Transkriptionsfaktoren, benötigen Hsp90 um ihre finale native Struktur zu erhalten (Wandinger et al., 2008). Inhibitoren von Hsp90, wie Geldanamycin und seine Derivate, können den HSR induzieren und z.B. Huntingtin-Aggregation inhibieren, so dass diese möglicherweise gegen die später beschriebenen Amyloidosen eingesetzt werden können (Stebbins et al., 1997; Sittler et al., 2001).

Daneben gibt es zwei weitere Familien molekularer Chaperone, welche auch eine Rolle bei der Prävention der Aggregation spielen, nämlich die kleinen Hsps und die Hsp100-Familie. Die kleinen Chaperone, z.B. Hsp27, können an Aggregate binden, ihre physiko-chemischen Eigenschaften verändern, so dass Hsp100- und Hsp70-Chaperone sie effizient resolubilisieren und sie dadurch zurück in das Netzwerk der Chaperone gelangen können (Lee et al., 2006).

Zusammenfassend stellen die molekularen Chaperone die wichtigsten zellulären Proteine gegen Fehlfaltung und Aggregation anderer Proteine dar. Sie sind in einem hochgeordneten Netzwerk organisiert mit teilweise pleiotropen Aktivitäten, die eine möglichst vollständige Erfassung bei der Faltung des Proteoms sicherstellen.

## 2.4 Proteinhomöostase (Proteostase)

Unter Proteinhomöostase oder Proteostase versteht man die Kontrolle der Konzentration, Konformation, Interaktion (auch Quartärstruktur) und Lokalisation individueller Proteine im Proteom. Dabei wird das Proteom dergestalt verändert, dass die für Zellen erreichbaren physiologischen Leistungen in optimaler Weise erreicht werden können. Die Proteostase beeinflusst damit spezifische zelluläre Funktionen und ermöglicht es auch differenzierten Zellen sich physiologisch zu adaptieren, sei es an die Entwicklung des Organismus, sei es an veränderte exogene Einflüsse, oder an fortschreitendes Alter. Die Proteostase wird durch die Biochemie der Proteinfaltung oder –fehlfaltung ebenso beeinflusst wie durch das Netzwerk an

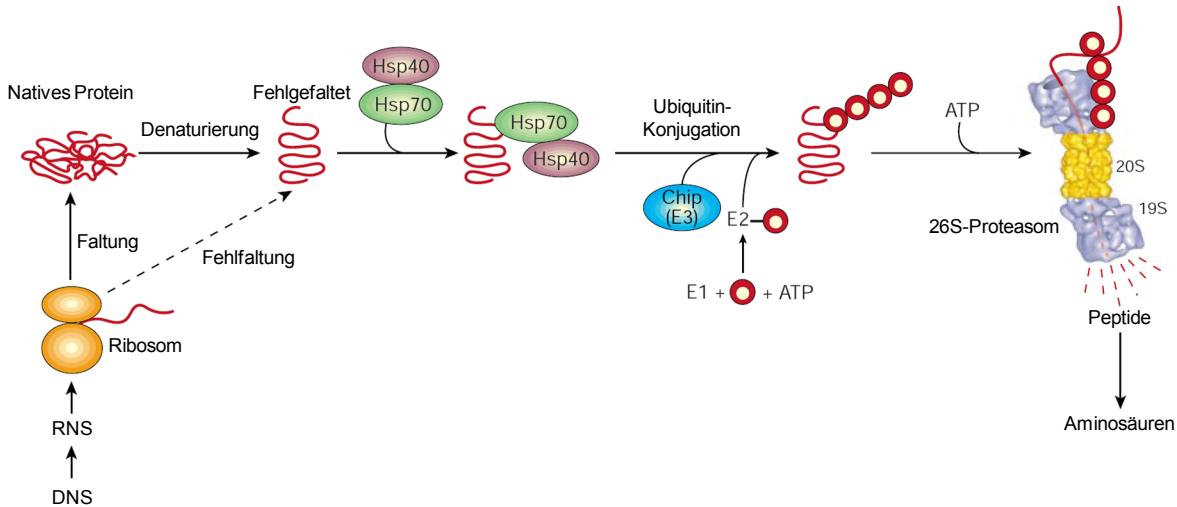
Interaktoren und konkurrierenden biochemischen Reaktionen. Dabei wird die Regelung der Proteostase über Proteinsynthese (Transkription und Translation), Proteinfaltung, (Dis-) Aggregation, Transport und Degradation vorgenommen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Wiseman et al., 2007; Werner et al., 1996; Ron und Walter, 2007; Cohen et al., 2006; Morimoto, 2008).

Das Zusammenspiel der zellulären Proteinbiogenese, der Proteinfaltung und Proteindegradation wird auch als Proteinqualitätskontrolle bezeichnet und gehört zu den vielfältigen die Proteostase beeinflussenden Prozesse. Bereits auf dem Niveau der Transkription oder Translation kann es zu einer deutlichen Veränderung der Expression eines bestimmten Proteins kommen, wenn andere Faktoren dieses Prozesses nicht ordnungsgemäß funktionieren oder z.B. depletiert sind (Welnowska et al., 2009).

Molekulare Chaperone haben, wie unter 2.3 beschrieben, vielfältige Aufgaben und Fähigkeiten, so sind sie nicht nur für die Faltung der betreffenden Proteine zuständig, sondern leiten diese auch der Degradation zu (Goldberg, 2003).

Eine wichtige Degradationsmaschinerie für Proteine stellt das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) dar, welches einen großen Teil der Proteolyse im mammatischen Zytosol und im Nukleus durchführt (Ciehanover et al., 1978). Die meisten zytosolischen Proteine, welche degradiert werden sollen, werden durch eine kovalente Bindung an bestimmte Lysinreste mit dem Protein Ubiquitin versehen (Pickart, 2001). Hierbei wird Ubiquitin zunächst durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert und dann auf ein Ubiquitin-transferierendes Enzym (E2) übertragen. E2 verbindet das so aktivierte Ubiquitin mit Hilfe der Ubiquitin-Ligase (E3) mit dem entsprechenden Proteinsubstrat, polyubiquitylierte Proteinsubstrate werden erkannt und durch das Proteasom degradiert. Das Holoproteasom, welches auch als 26S-Proteasom bezeichnet wird, besteht aus einer Fass-ähnlichen katalytischen 20S Untereinheit und zwei 19S regulatorischen Untereinheiten, die quasi Verschlüsse dieses Fasses darstellen (Voges et al., 1999). Diese regulatorischen Untereinheiten können weiter in zwei Subkomplexe unterteilt werden, einen abschließenden Deckel und eine Basis. Die Deckeleinheit ist in der Lage die ubiquitylierten Substrate zu erkennen und zu binden. Die Basiseinheit enthält einen Ring bestehend aus sechs AAA-ATPasen, welche den Entfaltungsprozess und die Translokation des Substrates in die katalytische Einheit der 20S Untereinheit vermittelt. Parallel werden die Ubiquitinreste vom Substrat freigesetzt und recycelt (Voges et al., 1999; Gonzalez et al., 2002). Interessant sind mögliche Verbindungen zwischen dem Chaperon-System und dem UPS. So wurde z.B. beobachtet, dass eines der E3-Enzyme, nämlich CHIP (mit dem Carboxyterminus von Hsp70 interagierendes Protein),

fehlgefaltete oder mutierte Proteine selektiv ubiquitiniylieren kann (Meacham et al., 2001; Murata et al., 2001), wobei es die molekularen Chaperone Hsp70 oder Hsp90 bindet, welche ihrerseits ungefaltete und entfaltete hydrophobe Domänen erkennen und binden können. Durch proteasomale Degradation präexistierender Proteine wird auch die Zelle bei akutem Aminosäuremangel mit Aminosäuren aus degradierten Proteinen versorgt (Vabulas und Hartl, 2005).



**Abb. 2.3: Zusammenhang zwischen Chaperon-System und Ubiquitin-Proteasom-System.** Die am Ribosom synthetisierten Polypeptidketten können mit Hilfe molekularer Chaperone ihre native Form einnehmen oder fehl falten. Auch gefaltete Proteine können nachträglich durch z.B. chemische Agenzien oder thermischen Stress fehl falten. Diese werden ebenfalls von molekularen Chaperonen erkannt, welche die Kontakte zu E3-Enzymen, Cochaperonen (z.B. CHIP), herstellen. Die E3-Ligasen sorgen für eine Ubiquitinierung (Ubiquitin: braune Kugeln) des fehlgefalteten Proteins, so dass dieses zum Proteasom geleitet und in Peptide und nachfolgend Aminosäuren degradiert werden kann (modifiziert nach Goldberg, 2003).

Degradation kann auch mittels Autophagie in der Zelle realisiert werden. In mammalischen Organismen werden drei verschiedene Autophagietypen unterschieden: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) (Cuervo et al., 2005). Bei dem Prozess der Makroautophagie und der Mikroautophagie werden komplett Zytosomaanteile, einschließlich löslicher Proteine und Organellen, als Ganzes der lysosomalen Degradation zugeführt. Bei der CMA werden nur lösliche Proteine über die lysosomale Membran hinweg transloziert. Es wird angenommen, dass in den meisten Geweben die Mikroautophagie den konstitutiven Mechanismus für die Degradation intrazellulärer Komponenten in Lysosomen darstellt und verantwortlich für den kontinuierlichen Umsatz von langlebigen Proteinen und Organellen ist. Obwohl basale Aktivitäten der Makroautophagie und CMA nachgewiesen wurden, werden diese Wege der Degradation am meisten nach Stresssituationen der Zelle aktiviert. Es wurde nachgewiesen, dass Makroautophagie durch ein Hungern des Organismus, Pathogene oder durch physikalische Schädigung aktiviert werden kann (Ravikumar et al., 2009), während CMA

durch anhaltendes Hungern, oxidativen Stress oder chemische Agenzien, welche selektiv bestimmte intrazelluläre Proteine schädigen, ausgelöst werden kann (Massey et al., 2006). Die selektive Natur der Chaperone, der CMA und des UPS macht diese Systeme zu idealen Kandidaten, um fehlgefaltete Proteine selektiv zu degradieren.

Temporäre zelluläre Anpassung an die Proteostase ist ein notwendiger Prozess, um auf das ständig wechselnde Proteom während Ontogenese und Seneszenz, während exogenem Stress und endogen veränderten Proteinen (Mutationen) zu reagieren (Hammarstrom et al., 2003). Deshalb haben Zellen bestimmte Sensoren entwickelt, um Veränderungen im Proteom zu registrieren, entsprechend darauf zu reagieren und die Proteinhomöostase wieder herzustellen. Diese Mechanismen umfassen den HSR (heat shock response, Hitzeschockantwort), welche die zytoplasmatische Proteostase reguliert (Westerheide und Morimoto, 2005), und den UPR (unfolded protein response), welche den exozytischen Weg einiger Proteine ausgehend vom ER regelt (Ron und Walter, 2007). Zudem wurde festgestellt, dass einige Zellen eine gewisse Proteostase-Kapazität besitzen, welche überschritten werden kann, wenn ein bestimmtes fehlgefaltetes Protein stark exprimiert wird (Gidalevitz et al., 2006). Ein altersabhängiger Rückgang der proteostatischen Kontrolle zusammen mit einer Zunahme der Proteinoxidation ändert die Stabilität des Proteoms und damit die Proteinhomöostase, was ebenfalls eine Erklärung dafür liefern könnte, warum einige Amyloidosen, insbesondere die neurodegenerativen, erst mit fortschreitendem Alter manifest werden (Zhang et al., 2004).

## 2.5 Proteinfaltungskrankheiten

Eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen ist auf Proteinfaltung zurückzuführen. Diese Krankheiten können pathologische Formen beinhalten, bei welchen ein endogen oder exogen determinierter Defekt der Proteinfaltung eines bestimmten Proteins oder mehrerer Proteine vorliegen kann. Diese Verminderung der Proteinfaltung kann das Ergebnis posttranskriptionaler Prozesse sein, wie eingeschränkte Degradation *via* ERAD oder ein unzureichender Transport durch die Zelle, z.B. bei zystischer Fibrose (Mukoviszidose), (Amaral, 2004; Lomas et al., 2002).

Die größte Fraktion der Proteinfaltungskrankheiten ist mit der Konversion von monomeren nativen Proteinen in fibrilläre Aggregate verbunden. Diese Strukturen werden als amyloide Fibrillen oder auch makroskopisch als Plaques bezeichnet, wenn sie extrazellulär aggregieren, und als Inklusionen oder Einschlusverbindungen, wenn sie intrazellulär

akkumulieren (Westerman et al., 2005). Entsprechend werden Krankheiten oder pathologische Erscheinungsbilder, verbunden mit der Bildung amyloider Ablagerungen, als Amyloidosen bezeichnet. Das Wort „amyloid = stärkeähnlich“ leitet sich aus dem griechischen *’αμυλον* für Mehl, Stärke ab, da diese Proteine wie Stärke eine Reaktion mit Lugol’scher Lösung zeigen, wurde 1838 von Schleiden geprägt und 1854 von Virchow in die medizinische Terminologie übernommen.

Die Erkrankungen können allgemein in neurodegenerative Amyloidosen, bei welchen die Aggregation spezifisch im Zentralnervensystem (ZNS) stattfindet, in nicht-neuropathische Amyloidosen (Aggregation findet in bestimmten Geweben außerhalb des Gehirns statt) und nicht-neuropathische systemischen Amyloidosen, wo Aggregation in diversen Gewebetypen stattfindet, eingeteilt werden (Chiti und Dobson, 2006).

### 2.5.1 Neurodegenerative Amyloidosen

Neurodegenerative Erkrankungen wie *M. Parkinson*, *M. Alzheimer*, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Polyglutamin- (PolyQ-) Krankheiten einschließlich *C. Huntington*, sind Folge einer abnormalen Proteinfaltung und –interaktion im ZNS. Alle diese Krankheiten haben gemeinsam, dass sie zu charakteristischen Ablagerungen im Gehirn führen, welche zytoplasmatisch, nuklear oder extrazellular lokalisiert sein können (DiFiglia et al., 1997; Ross und Poirier, 2004; Cohen und Kelly, 2003; Dawson und Dawson, 2003). Die damit einhergehende Proteinaggregation kann von einer Mutation in der Sequenz des entsprechenden Proteins, einer genetischen Veränderung, welche zu einer Erhöhung der Proteinmenge eines spezifischen Proteins führt, oder auch durch umweltbedingten Stress oder Alterung ausgelöst werden (Ross et al., 2006). Insbesondere bei den neurodegenerativen Erkrankungen wurden große intrazelluläre oder extrazelluläre Akkumulationen nachgewiesen, welche häufig intrazellulär als Einschlussskörper vorliegen. Diese Einschlussskörper (Einschlussverbindungen, Inklusionen) bestehen aus dem pathologischen Protein in fibrillärer aggregierter Form und sind amyloid (s. Abb. 2.4), beinhalten aber auch anderes Material (Sunde et al., 1997). Jedoch können auch Proteine, welche nicht mit Amyloidosen assoziiert werden, Aggregate bilden und toxische Auswirkungen auf zellulärem Niveau haben (Dobson, 2003; Stefani und Dobson, 2003). Bekannte Beispiele neurodegenerativer Amyloidosen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Zu den PolyQ-Erkrankungen zählen *C. Huntington*, die Spinocerebellaren Ataxien, Spinobulbuläre Muskelatrophie (SBMA) oder *M. Kennedy* und die Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie (DRPLA). Die PolyQ-assoziierten Erkrankungen

weisen die höchste Inzidenz der erblichen neurodegenerativen Krankheiten auf (Riley und Orr, 2006). Sie werden alle durch eine Expansion einer PolyQ-Sequenz hervorgerufen, welche als repetitives CAG im Genom codiert wird, so dass ein allen gemeinsamer pathogener Mechanismus postuliert wird (Orr und Zoghbi, 2001).

**Tab. 2.1: Übersicht über einige neurodegenerative Amyloidosen (nach Chiti und Dobson, 2006).**

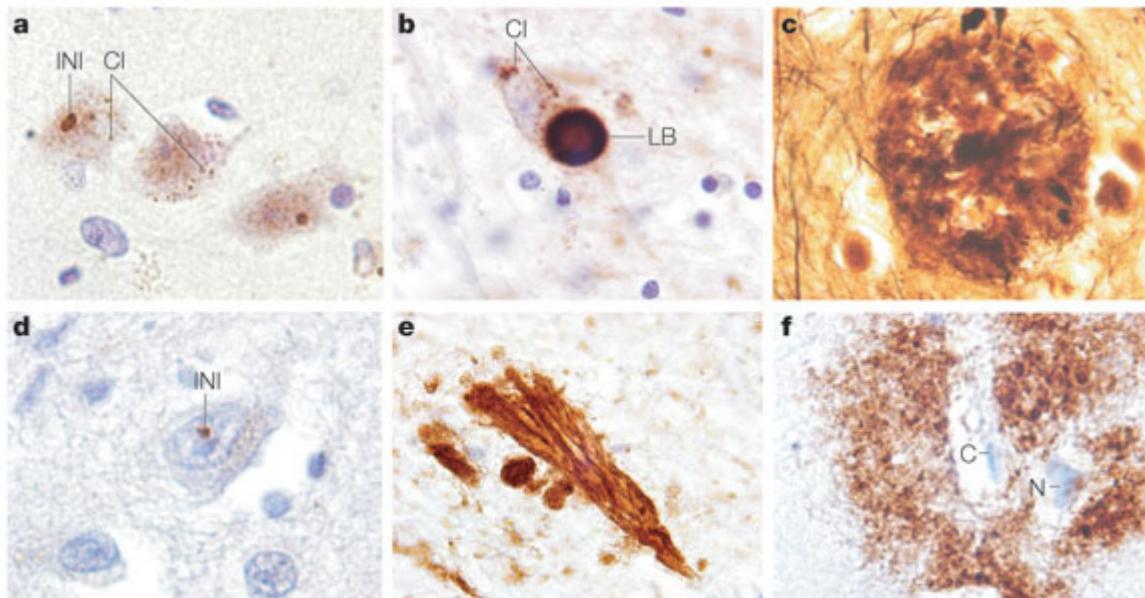
Erkrankung	Beteiliges Protein	Anzahl der As-Reste
<i>M. Alzheimer</i>	A $\beta$	40 oder 42
Spongiforme Enzephalopathien	Prion-Protein Prp <sup>sc</sup>	253
<i>M. Parkinson</i>	$\alpha$ -Synuklein	140
Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus	$\tau$	352 - 441
ALS	SOD1	153
<i>C. Huntington</i>	Huntingtin	3144
Spinocerebellare Ataxien	Ataxin	816
Spinocerebellare Ataxie 17	TBP	339
SBMA	Androgenrezeptor	919
DRPLA	Atrophin-1	1185
Familiäre britische Demenz	ABri	23
Familiäre dänische Demenz	ADan	23

Die Länge der nicht-expandierten PolyQ-Reste variiert zwischen 10 bis 39 Q in nicht betroffenen Individuen. Eine über einem gewissen Schwellenwert liegende Anzahl von PolyQ-Resten, die für jede Krankheit charakteristisch ist, führt zur Proteinfaltung und zum Ausbruch der Krankheit (Scherzinger et al., 1997). Die repetitive CAG-Sequenz ist nicht sehr stabil, und mutierte Formen zeigen sowohl in somatischen, als auch in Zellen der Keimbahn Instabilitäten, so dass von Generation zu Generation die Länge der PolyQ-Reste zunehmen kann, was mit immer früherem Ausbruch der Erkrankung einhergeht, ein Phänomen, welches als genetische Antizipation bezeichnet wird (Gatchel und Zoghbi, 2005). Auf *C. Huntington* wird unter 2.6.3 weiter eingegangen.

Die Alzheimer'sche Krankheit (*M. Alzheimer*) gehört zu den progressiven fatalen Demenzerkrankungen, welche gewöhnlich in fortgeschrittenem Alter manifest wird, wobei jedoch bestimmte genetische Formen eine frühe Manifestation aufweisen (Hardy, 2004). Charakteristisch für *M. Alzheimer* sind extrazelluläre amyloide, das A $\beta$ -Peptid enthaltende Plaques, welche aus dem amyloiden Precursorprotein APP prozessiert werden. Ferner finden sich vermehrt neurofibrilläre Stränge, welche hyperphosphoryliertes und mit Neurofilamenten assoziiertes Protein  $\tau$  akkumulieren.

Bei *M. Parkinson*, auch als Schüttellähmung bezeichnet, handelt es sich um eine progressive neurodegenerative Erkrankung des extrapyramidal-motorischen Systems. Als

Symptome treten Rigor, Tremor und Akinese auf, verbunden mit verschiedenen vegetativen und kognitiven Störungen. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch ein Absterben von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra*, wobei der Mangel an Dopamin schließlich zu einer Reduktion der aktivierenden Wirkung der Basalganglien auf die Großhirnrinde führt. Ein Charakteristikum der Erkrankung sind die Lewy-Körper, welche eosinophiles fibrilläres Material aus  $\alpha$ -Synuklein und Neurofilamenten, Synphilin-1 und Parkin einschließen (Winklhofer und Tatzelt, 2006; Waxman und Giasson, 2009).



**Abb. 2.4: Verschiedene intranukleäre, cytoplasmatische und extrazelluläre Aggregate und Einschlussverbindungen in lichtmikroskopischer Darstellung.** In (a) sind intranukleäre Inklusionen (INI) und zytoplasmatische Inklusionen (CI) *in situ* eines von *C. Huntington* betroffenen Hirnschnittes mit Hilfe eines für expandiertes PolyQ spezifischen Aks angefärbt. In Teil (b) wurden Lewis-Körper (LB) und zytoplasmatische Inklusionen (CI) bestehend aus  $\alpha$ -Synuklein in der *Substantia nigra* visualisiert. Plaques des A $\beta$ -Peptides bei *M. Alzheimer* wurden mit Hirano-Silberfärbung in (c) dargestellt. (d) repräsentiert intranukleäre Inklusionen (INI), welche mit  $\alpha$ -Ubiquitin-Ak detektiert wurden und das Vorhandensein anderer Proteine als des pathologischen in Aggregaten bei *C. Huntington* belegen. Phosphoryliertes  $\tau$ -Protein wurde in (e) im Hippocampus bei *M. Alzheimer* nachgewiesen. Ein für *M. Alzheimer* charakteristischer Plaque wurde in (f) dargestellt, wobei N für Neuron und C für Kapillare steht, Abbildung nach Ross und Poirier, 2005.

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine degenerative Erkrankung des motorischen Nervensystems, wobei es zu einer fortschreitenden und irreversiblen Schädigung oder Degeneration der Motoneurone kommt. In vielen Fällen ist die Superoxiddismutase (SOD) in einer autosomalen dominanten Form mutiert, einhergehend mit Proteinaggregation (Wood et al., 2003). Weitere neurodegenerative Erkrankungen sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

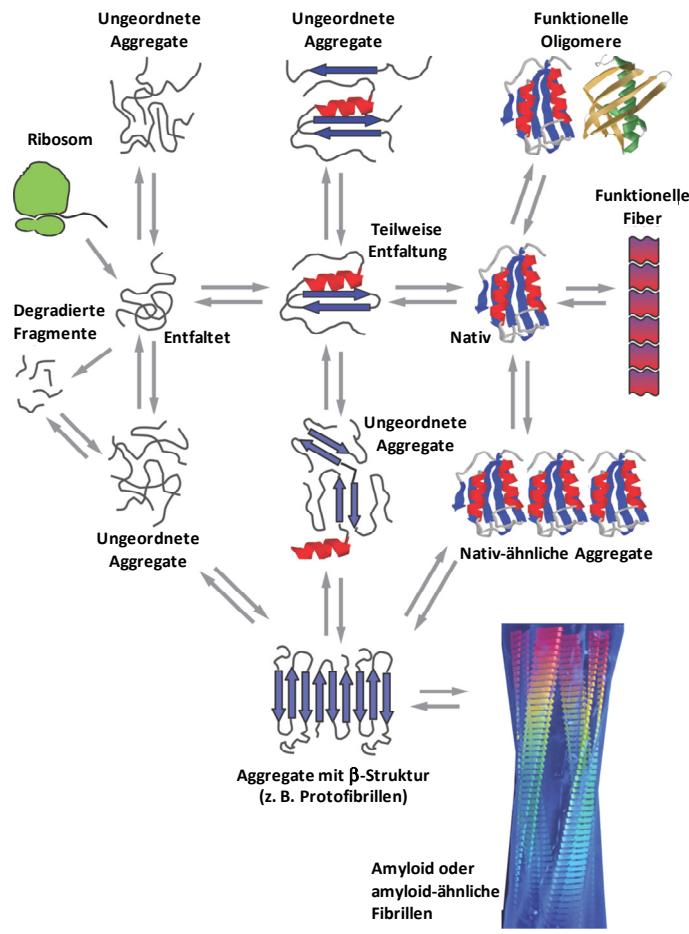
## 2.5.2 Aggregation und Bildung amyloider Strukturen

Alle mit Amyloidosen assoziierten Erkrankungen sind durch Aggregation eines spezifischen Proteins gekennzeichnet, wobei auch andere Verbindungen wie Kohlenhydrate oder

modifizierte Proteine in die Aggregate inkorporiert werden können. Während in neurodegenerativen Amyloidosen die Mengen der Aggregate manchmal kaum zu detektieren sind, können bei systemischen Amyloidosen Aggregate im Kilogrammbereich aus einem oder mehreren Organen isoliert werden (Tan und Pepys, 1994). Die Länge und Struktur der löslichen Monomere der einzelnen krankheitsassoziierten Proteine variiert beträchtlich (s. auch Tab. 2.1), während ihre aggregierten Formen viele Eigenschaften gemeinsam haben (Sunde und Blake, 1997). Amyloide Strukturen zeigen alle ähnliche optische Eigenschaften wie z.B. Doppelbrechung oder binden gewisse diagnostische Farbstoffe wie z. B. Kongorot (bereits von Virchow eingesetzt, s. auch Kapitel 2.5), Thioflavin T oder NIAD-4. Die fibrillären Strukturen vieler Aggregattypen sind einander sehr ähnlich, nämlich unverzweigt, um die eigene Achse gewunden, was ihnen eine bemerkenswerte Stabilität verleiht, besitzen einen hohen Anteil  $\beta$ -Faltblätter und erzeugen eine charakteristische Kreuz- $\beta$ -Brechung bei der Röntgenstrukturanalyse (Sunde und Blake, 1997). Die Fähigkeit von Proteinen amyloide Strukturen auszubilden scheint nicht auf eine kleine Gruppe krankheitsassozierter Proteine beschränkt zu sein, sondern ist wahrscheinlich eine allgemeine Eigenschaft von Polypeptidketten, wenn sie zur Instabilität gezwungen werden. So wurde gezeigt, dass Fibrillen auch *in vitro* von vielen anderen Proteinen, einschließlich der als globulär bekannten Proteine wie Myoglobin, oder Homopolymere wie Polylysin, ausgebildet werden können (Dobson, 2001). Mit Hilfe von Techniken wie Röntgenstrukturbreugung (Sunde und Blake, 1997), Kryoelektronenmikroskopie (Jimenez et al., 1999) und Festphasen-NMR konnten einige Modelle die Struktur der amyloiden Fibrillen treffend aufgestellt werden. Aus diesen Experimenten wurde verallgemeinernd der Schluss gezogen, dass die Fibrillen typischerweise aus 2 – 6 Protofilamenten bestehen, wobei jedes Protofilament 2 – 5 nm Durchmesser besitzt (Serpell, et al. 2000). Die Protofilamente sind dabei umeinander verdreht und bilden die Fibrillen, welche 7 – 13 nm breit sind, einhergehend mit seitlicher Anlagerung und der Bildung von bis zu 30 nm langen Fibrillen (Saiki et al., 2005).

Die relativen Aggregationsraten vieler Proteine korrelieren mit den physiko-chemischen Eigenschaften dieser Moleküle wie Ladung, Hydrophobizität oder Größe der As-Reste (Chiti et al., 2003). *In vitro* Experimente haben Aufschluss darüber gegeben, dass die Bildung amyloider Fibrillen generell mit einer Lag-Phase beginnt, gefolgt von einem schnellen Wachstum der Fibrillen (Caughey und Lansbury, 2003). Solches Verhalten wird auch bei Nukleationsprozessen nachgewiesen, und ähnlich wie beim Zufügen eines Nukleationskeims kann auch hier durch Zugabe von Aggregaten zu einer Lösung des betreffenden Proteins ohne Aggregate die Lag-Phase eliminiert werden. Nicht nur

vorgeformte Aggregate können als Keime für weitere Aggregation dienen, sondern auch deamidierte oder oxidierte Proteine können in einigen Fällen einen den Nukleationsprozess beschleunigenden Faktor darstellen, und damit den Ausbruch einer jeweiligen Krankheit eventuell auslösen (Nilsson et al., 2002).



**Abb. 2.5: Übersicht möglicher struktureller Proteinkonformationen und Möglichkeiten ihrer Konvertierung.**

Eine unstrukturierte, neu translatierte Polypeptidkette kann über Intermediate, welche nur teilweise gefaltet sind, in eine monomere native Struktur falten bzw. gefaltet werden. Das native Protein, jedoch in einigen Fällen auch daraus gebildete Fibrillen oder Oligomere, können ebenfalls ihre biologische Funktion erfüllen. Native Proteine können einerseits reversibel partiell entfaltet werden, andererseits in nativ-ähnlichen Aggregaten akkumulieren, welche ihrerseits Aggregate mit  $\beta$ -Struktur ausbilden können. Entfaltete oder teilweise entfaltete Monomere können dagegen, wenn sie nicht degradiert werden, ungeordnete Aggregate bilden. Diese können amorph sein, oder bereits Anzeichen präfibrillären Wachstums aufweisen, so dass auch auf diesem Wege die Genese von Aggregaten mit  $\beta$ -Struktur (z.B. Prototibrillen) möglich ist. Diese stellen Vorstufen der amyloiden oder amyloid-ähnlichen Proteine dar, welche lange Fibrillen bilden können. Die hier dargestellten Konversionen werden unterstützend durch aktivierende Oberflächen wie Membranen, Proteine oder spezielle Chaperone ineinander überführt (modifiziert nach Chiti und Dobson, 2006).

Die erste Phase der Genese amyloider Formen geht meistens mit der Bildung löslicher Oligomere durch relativ unspezifische Interaktionen einher, obwohl es auch einige Fälle gibt, bei welchen spezifische strukturelle Veränderungen und nachfolgende Interaktionen die Formierung der Oligomere begünstigen (Schlunegger et al., 1997). Die ersten aggregierten Spezies, welche mit Hilfe der Elektronenmikroskopie oder der Atomkraftmikroskopie visualisiert werden können, sind kugelförmig und werden als amorphe Aggregate beschrieben. Diese frühen präfibrillären Aggregate werden bei geeigneten Bedingungen in Spezies mit spezifischer Morphologie überführt. Bei diesen spezifischen Spezies kann es sich zunächst um Prototibrillen handeln, die aus löslichen kurzen Fibrillen mit Aggregat-ähnlicher Struktur bestehen und gewöhnlich dünner und kürzer als eine gereifte Fibrille sind (Harper et al., 1997; Walsh et al., 1999), so dass diese Prototibrillen in die Rubrik „Intermediate“ eingeordnet wurden (s. auch Abb. 2.5). Weiter kann die Assoziation in Protofilamente

stattfinden, worunter die einzelne reife amyloide Fibrille verstanden wird, wobei wahrscheinlich die Vollendung zur Fibrille durch laterale Assoziation der Vorstufen geschieht. Unter Intermediaten wird eine putative metastabile Gattung aggregierter Moleküle verstanden, welche Vorstufen bei der Bildung von Fibrillen sein können, jedoch ihrerseits größere Aggregate oder sogar Einschlusskörper bilden können. Es wird angenommen, dass die sich zuerst bildenden Aggregate anarche Strukturen einnehmen, welche zur Umgebung Aminosäurereste präsentieren, die im nativen Protein gewöhnlich im Inneren verborgen sind (Bucciantini et al., 2002). Es sind jedoch Fälle bekannt, wo auch die frühen Aggregate sehr distinkte Strukturen einnehmen, einschließlich wohldefinierter anulärer Strukturen (Lashuel et al., 2002ab). Bereits präfibrilläre Spezies zeigen bemerkenswert ähnliche Eigenschaften und es wurden bestimmte Antikörper (Aks) entwickelt, die unabhängig von dem jeweiligen Protein diese Strukturen erkennen können (Kayed et al., 2003; Kayed und Glabe, 2006).

### 2.5.3 Toxische Spezies

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargestellt, können fehlgefaltete Proteine viele unterschiedliche Strukturen einnehmen. Verbunden mit dieser Beobachtung stellt sich im Zusammenhang mit den mutierten, fehlgefalteten Proteinen neurodegenerativer Erkrankungen die wichtige Frage: Was sind die zytotoxischen Spezies? Sind es die bereits fehlgefalteten Monomere, die Intermediate oder doch die fibrillären Aggregate oder eine Kombination dieser Spezies? Oder führt möglicherweise der dynamische Prozess der Aggregation selbst zur Degeneration der Zellen oder die Deprivation von Schlüsselmolekülen zum Kollabieren zellulärer Funktionen?

Aggregation ist wahrscheinlich ein komplexer, vielstufiger Prozess mit vielen möglichen Intermediaten, einschließlich oligomerer und präfibrillärer Formen. Bestimmte molekulare Strukturen könnten für die Toxizität verantwortlich sein, z.B. Monomere, Oligomere, Protofibrillen oder spezielle amyloide Formen, es wurden Strukturen nachgewiesen, die von vielen aggregierenden Proteinen gebildet werden (Stefani und Dobson, 2003; Dobson, 2003; Bucciantini et al., 2004; O’Nuallain und Wetzel, 2002; Kayed et al., 2003). Es wäre z.B. möglich, dass es eine für alle fehlgefaltenden, amyloiden Proteine gemeinsame toxische Struktur gibt, welche auch nach ihrer Assemblierung in Oligomere und Fibrillen erhalten bleibt (Pieri et al., 2006).

Toxizität könnte andererseits auch durch die Exposition ungewöhnlicher Strukturen (hydrophober Strukturen) bedingt sein, welche normalerweise im globulären Protein unter

nativen Bedingungen der Umgebung nicht zugänglich sind. Neben hydrophoben sind auch NH- und CO-Gruppen des Proteinrückgrats interessant, denn sie könnten in einer anomalen  $\beta$ -Konformation nicht-native Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Es wurde in diesem Zusammenhang auch vorgeschlagen, dass z.B. die abnorme Faltung der aggregierenden Proteine eine toxische Oberfläche oder Plattform bildet, so dass andere Moleküle hier bevorzugt binden können, und diese Bindung könnte ähnlich des aktiven Zentrums eines Enzyms die Konversion anderer Moleküle beeinflussen (Yoshiike et al., 2007).

Basierend auf dieser Hypothese sollte nicht nur eine toxische Spezies eines einzelnen Proteins *per se* für die destruierenden Effekte verantwortlich sein, sondern verschiedene Strukturen mit ähnlichen Oberflächen könnten die toxischen Effekte auslösen.

Schon bevor fehlgefaltete Monomere oligomerisieren, könnten sie toxische Interaktionen mit anderen zellulären Komponenten eingehen, wobei verschiedene abnorme Konformationen der Monomere unterschiedliche Interaktionen eingehen könnten. So wurden z.B. in Prion-Proteinen verschiedene anomale monomere Konformationen nachgewiesen, die über Artgrenzen hinweg die Toxizität auslösen könnten (Tanaka et al., 2004; Weissmann 2005).

Einige Ergebnisse sprechen heute dafür, dass nicht große Aggregate, amyloide Fibrillen oder intrazelluläre Einschlussverbindungen das zytotoxische Agens darstellen, sondern deren Vorstufen, präfibrilläre Oligomere und intermediäre Formen (Walsh et al., 2002ab; Arrasate et al., 2004; Behrends et al., 2006). Dieser Befund würde auch erklären, dass die beobachteten Symptome bei *M. Alzheimer* oder *C. Huntington* auftreten, bevor Einschlussverbindungen oder Plaques nachweisbar sind (Walsh und Selkoe, 2004). In einigen Versuchen erwiesen sich präfibrilläre Formen bestimmter Proteine, welche normalerweise nicht mit Amyloidosen in Zusammenhang gebracht wurden, als zytotoxisch in der Zellkultur, wohingegen die nativen Monomere und amyloiden Fibrillen nur eine geringe Zytotoxizität aufwiesen (Malisauskas et al., 2005; Takahashi et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde lösliches A $\beta$  direkt in das Gehirn von Ratten injiziert und die toxischen Effekte auf die synaptische Plastizität detektiert. Parallel wurde das A $\beta$ -Material mit Insulin-degradierendem Enzym vorbehandelt, welches gezielt die A $\beta$ -Monomere degradiert. Diese A $\beta$ -Proben waren dennoch zytotoxisch und zeigten negative Auswirkungen auf die synaptische Plastizität der Tiere, ein weiterer Hinweis, dass lösliche A $\beta$ -Oligomere die toxischen Spezies wenigstens in diesem Fall darstellen (Walsh et al., 2002a). Oligomere können zudem über Größenausschlusschromatographie gereinigt werden, und durch Oligomere induzierte Zytotoxizität kann durch Coinjektion eines Oligomer-spezifischen monoklonalen Antikörpers

abgeschwächt werden (Klyubin et al., 2005). Es stellt sich dann die Frage, warum Oligomere toxischer sind als z.B. große Aggregate oder Fibrillen. Dies könnte eine Frage des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen sein, so dass viele kleinere Oligomere eine größere Interaktionsfläche präsentieren, z.B. mit hydrophoben Resten, welche normalerweise im Inneren eines Proteins liegen.

Es wurden für  $\alpha$ -Synuklein verschiedene Aggregattypen und Intermediate beschrieben, einschließlich oligomerer Assemblierungen, Protofibrillen und anuläre Strukturen, welche eventuell zirkularisierte Protofibrillen darstellen könnten. Biophysikalische Untersuchungen gaben Hinweise, dass die anulären Strukturen Poren in Zellmembranen bilden können (Lashuel et al., 2002ab). Mit gereinigtem Htt Exon-1 (expandierte Form) wurden ebenfalls verschiedene Aggregattypen nachgewiesen. Es traten bei der Analyse zuerst globuläre Assemblierungen auf, gefolgt von Protofibrillen und schließlich reife Fibrillen (Poirier et al., 2002), so dass auch bei *C. Huntington* Oligomere bei der Pathogenese eine kritische Rolle spielen könnten (Behrends et al., 2006).

Obwohl Einschlusskörper zunehmend als inert betrachtet werden (s. 2.5.5), kann es jedoch sein, dass wichtige zelluläre Komponenten durch sie sequestriert und damit ihrer Funktion entzogen werden, was zur Zytotoxizität beitragen könnte (Perez et al., 1998; McCampbell et al., 2000; Chai et al., 2002; Schaffar et al., 2004).

#### **2.5.4 Mögliche Wege zur Zytotoxizität**

Unabhängig von der Natur der toxischen Spezies könnte der Weg zur Zytotoxizität verlaufen, wobei eine Kombination aus verschiedenen toxischen Strukturtypen und Mechanismen der Toxizität vorstellbar ist. Dabei sind die Mechanismen zur Toxizität eng verbunden mit den zellulären Möglichkeiten sich vor dieser zu schützen (wie im nächsten Abschnitt 2.5.5 beschrieben).

Eine Hypothese besagt, dass anomal gefaltete Proteine, insbesondere expandierte PolyQ-Proteine, das Proteasom inhibieren können (Bence et al., 2001). Dabei gehen Studien und Meinungen bis heute auseinander, ob das Proteasom direkt oder indirekt durch expandierte PolyQ-Sequenzen inhibiert wird, denn es wurde gezeigt, dass PolyQ-Sequenzen, unerheblich ob in physiologischer oder pathologisch-expandierter Länge, nur unter Schwierigkeiten vom Proteasom prozessiert werden können (Venkatraman et al., 2004; Verhoef et al., 2002; Jana et al., 2001). Andererseits wurde berichtet, dass mutierte, fehlgefaltete Proteine im Nukleus einer Zelle die Proteasomen im Zytoplasma inhibieren

können und *vice versa* (Bennett et al., 2005), so dass es Belege für einen indirekten Mechanismus gibt, wobei es weitere Indizien für diesen Mechanismus *in vivo* gibt (Bowman et al., 2005). Auch fehlgefaltetes  $\alpha$ -Synuklein kann zu einer Inhibition des UPS führen (Tanaka et al., 2001), was mit einer Arbeit konsistent ist, in der berichtet wird, dass systemisch angewandte Proteasom-Inhibitoren parkinsonoide Symptome in Ratten hervorrufen, begleitet von der Degradation dopaminerger Neuronen in der *Substantia nigra*, im *Striatum* und nach Gabe von Dopamin-Agonisten mit einer fortschreitenden Dyskinesie (McNaught et al., 2004).

Eine andere Möglichkeit, die auch wiederum eng mit der Protektion vor möglichen fehlgefalteten Proteinen assoziiert ist (s. 2.5.5), besteht in der Änderung der Autophagie, vor allem der Makroautophagie und der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA). So können mutierte Formen von  $\alpha$ -Synuklein die CMA inhibieren (Cuervo et al., 2004), ebenso wird durch expandierte Formen des Htt die Autophagie beeinflusst (Ravikumar et al., 2002).

Es gibt viele Hinweise, dass auch die Modifikation des intrazellulären Redoxstatus und die Konzentration des freien  $\text{Ca}^{2+}$  der Zelle, welche mit abnorm gefalteten Proteinen konfrontiert wurde, eine wichtige Rolle bei der beobachteten Zytotoxizität spielen können (Kourie, 2001; Hyun et al., 2002). Eine Modifikation des intrazellulären Redoxstatus in solchen Zellen geht oft mit einem deutlichen Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einher, was einige Parallelen der oxidativen Verteidigungsmittel von Leukozyten bei der Zerstörung fremder Zellen nach Phagozytose aufweist. Weiter wird darüber berichtet, dass direkte Effekte oxidativen Stresses und Alterns die Aktivität und Expressionslevel des Proteasoms und damit auch die Zellviabilität beeinflussen können (Keller, 2002). Demnach resultiert eine Inhibition des Proteasoms, sei es direkt oder indirekt, in einer Akkumulation oxiderter oder anderweitig modifizierter Proteine und folglich auch erhöhten zerstörerischen Einflüssen der ROS.

Wie bereits unter 2.5.3 beschrieben, wurde in einigen Beispielen gezeigt, dass präfibrilläre Spezies mit Zellmembranen interagieren können, ähnlich wie einige eukaryotische porenbildende Proteine, z.B. Perforin, bakterielle Toxine oder Proteine der BCL-2-Familie. Seit 1993 wurde die sogenannte Kanal-Hypothese vorangetrieben (Arispe et al., 1993), wonach die molekulare Basis für die Zytotoxizität amyloider Proteine die Bildung einer Pore oder eines Kanals in Zellmembranen darstellt, ähnlich der Toxizität porengemender Peptide oder Proteine (Kourie und Shorthouse, 2000). Demnach können besonders positiv geladene und fehlgefaltete Proteine bzw. ihre frühen Aggregate, mit Lipidmembranen interagieren. Nach dieser Hypothese würden fehlgefaltete Proteine,

besonders die in neurodegenerative Erkrankungen involvierten, die Zytotoxizität über die Poren in der Membran verursachen, und zwar als direkte Konsequenz der nicht-selektiven Ionenkanäle. Diese wurden für eine Reihe missgefalteter Proteine aus dem Feld neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben, z.B. das A $\beta$ -Peptid (Lin et al., 2001; Bhatia et al., 2000) und seine Fragmente (Mattson et al., 2000),  $\alpha$ -Synuklein (Volles und Lansbury, 2002), ein Fragment des Prion-Proteins (Kourie et al., 2001) und expandierte PolyQ-Proteine (Kagan et al., 2001; Monoi et al., 2000). Einen anderen Ansatz zur Erklärung der zytotoxischen Eigenschaften der abnorm gefalteten Proteine bietet die Sequestrierungshypothese, bei der davon ausgegangen wird, dass die fehlgefalteten Proteine, insbesondere ihre Aggregate, mit anderen zellulären Komponenten interagieren und diese damit ihrer Funktion entziehen, möglicherweise durch Einschluss in die Aggregate. Besonders im Bereich der PolyQ-assoziierten Erkrankungen wurde dies in mehreren Arbeiten gezeigt (Schaffar et al., 2004; McCampbell et al., 2000; Preisinger et al., 1999; Nucifora et al., 2001).

Ein globales Konzept wurde 2006 von Gidalevitz et al. in einem *C. elegans*-Modell für expandiertes Htt vorgeschlagen. Demnach können unter normalen physiologischen Bedingungen Polymorphismen in bestimmten Genen zu einer Expression von Proteinen führen, welche teilweise oder fluktuierend fehlgefaltet sind und durch das zelluläre Qualitätskontrollsystem prozessiert werden. In Anwesenheit eines chronisch fehlgefalteten Proteins, wie es mit neurodegenerativen Amyloidosen assoziiert ist, kann das Qualitätskontrollsystem einer Zelle jedoch überlastet werden und z.B. eine Degradation der betreffenden Proteine fehlschlagen. Normalerweise für die Zelle unschädliche Proteine werden dann auch nicht mehr länger korrekt gefaltet, was zu einer Dysfunktion vieler zellulärer Funktionen führt. Dies resultiert schließlich in einem *Circulus vitiosus*, so dass Fehlfaltung und Aggregation auch stabilerer Proteine zunehmen, verbunden mit einem Zusammenbruch vieler zellulärer Funktionen.

In engem Zusammenhang mit dem Zusammenbruch der Proteinhomöostase steht die Hypothese, dass intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs) oder zumindest Proteine mit intrinsisch unstrukturierten Regionen (IURs) sich als anfällig gegenüber fehlgefalteten Proteinen erweisen. Obwohl diese Proteine, zumindest partiell, unstrukturiert erscheinen, nehmen doch viele von ihnen kritische Schlüsselpositionen im zellulären Geschehen ein, einschließlich Zellteilung, Proteinfaltung, Signaltransduktion, Transkription und Translation (Iakoucheva et al., 2002). Einige der Proteine, die in ihrer mutierten Form neurodegenerative Erkrankungen hervorrufen wie z.B. APP oder Htt, enthalten IURs oder sind gar selbst IUPs

---

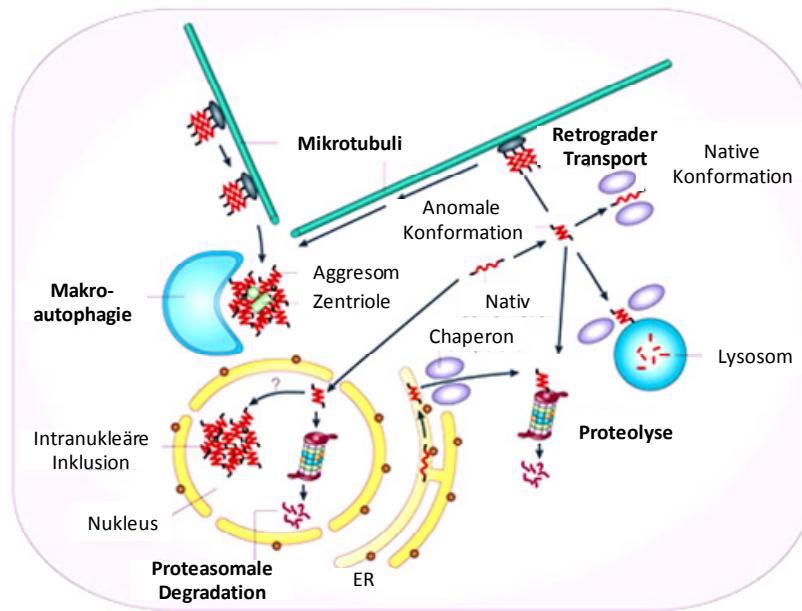
(Skrabana et al., 2006; Uversky, 2003; Vitalis et al., 2007; Sticht et al., 1995; Uversky und Fink, 2004). Zudem wurde beschrieben, dass Proteine, welche sekundär in die pathologischen Prozesse der neurodegenerativen Erkrankungen *M. Alzheimer*, *M. Parkinson* und *C. Huntington* involviert sind, einen größeren Prozentsatz Unstrukturiertheit aufweisen, über mehr Interaktionspartner verfügen und daher als zentrale zelluläre Verknüpfungspunkte bei Inaktivierung durch Interaktion mit fehlgefalteten Proteinen größeren Schaden anrichten können (Raychaudhuri et al., 2009).

Zusammenfassend ist wahrscheinlich keine Spezies der fehlgefalteten Proteine und kein Mechanismus toxisch *per se*, sondern es handelt sich vermutlich um einen multifaktoriellen Prozess der Aggregation und Interaktion mit vielen Schlüsselproteinen in der Zelle, welcher letztlich zu den beobachteten zytotoxischen Ereignissen führt.

### 2.5.5 Protektive Mechanismen

Um der vielen Proteinen inhärenten Tendenz zur Aggregation zu begegnen, entwickelten die Zellen Abwehrmöglichkeiten gegen Proteinfehlfaltung, Aggregation oder Bildung amyloider Strukturen. Einen Überblick über verschiedene Möglichkeiten der zellulären Verteidigung gegen fehlgefaltete Proteine und Aggregate gibt Abb. 2.6. Eine erste Stufe der Verteidigung stellen die molekularen Chaperone (s. auch 2.3) dar. Diese können die Fehlfaltung von Proteinen verhindern, sie rückgängig machen oder sie in einem nicht-toxischen Status halten.

Ähnlich dem Mechanismus der Interaktion von Hsp70 mit ungefalteten Substratproteinen, wurde in einem PolyQ-Modell gezeigt, das Hsp70 schnell an Aggregate assoziiert und dissoziiert (Kim et al., 2002). Andererseits sind Hsp70 und seine Cochaperone nicht in der Lage, bestehende fehlgefaltete, aggregierte Proteine der Amyloidosen dauerhaft in einen nativen Status zurückzufalten. Es kann sein, dass die Konformation aufgrund der Mutationen derartig verändert ist, dass eine Rückfaltung nicht möglich ist, bzw. das Protein sofort wieder in den fehlgefalteten Zustand zurückkehrt, es ist jedoch auch wahrscheinlich, dass die Chaperon-Kapazität, hier speziell die des Hsp70-Systems, mit fehlgefalteten Proteinen überlastet wurde (Gidalevitz et al., 2006). Letzteres würde insofern bei neurodegenerativen Amyloidosen eine Rolle spielen, als hier in vielen neuronalen Zelltypen Hsp70 unter Stressbedingungen nicht induziert werden kann (Kaarniranta et al., 2002; Marcuccilli et al., 1996). Es wurde demonstriert, dass Hsp70 und seine Cochaperone Aggregation und Zytotoxizität bei neurodegenerativen Amyloidosen supprimieren können (Muchowski et al., 2000; Dou et al., 2003; Klucken et al., 2004).



**Abb. 2.6: Zelluläre Abwehrmechanismen gegen aggregierte, anomale Proteine.** Ein normalerweise in seiner nativen Form funktionelles Protein kann eine anomale Konformation eingenommen haben, welche anfällig für Aggregation ist. Diese anomalen Proteine können in ihre native Konformation unter Energieaufwand mit Hilfe molekularer Chaperone (violett) zurückgefaltet werden. Erhält das Protein seine native Konformation nicht zurück, kann es mit Hilfe des retrograden Transports in ein zentrales Aggresom geschickt werden (häufig nahe der Zentriole), so dass resultierende Aggregate über Makroautophagie abgebaut werden.

werden können. Alternativ können sie über CMA und über den endosomalen/lysosomalen Weg abgebaut werden. Proteolyse solcher fehlgefalteter Proteine ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus über das UPS möglich. Fehlgefaltete Proteine im ER können *via* ERAD degradiert und ins Zytoplasma für proteasomale Degradation transportiert werden (Modifiziert nach Ross und Poirier, 2005).

Nicht nur Hsp70 selbst, sondern auch seine Cochaperone und auxiliare Interaktoren haben Einfluss auf die Faltung der aggregierenden Proteine. So wurde an mehreren Beispielen gezeigt, dass Hsp40 PolyQ-Aggregation aufhalten, Inklusionen verhindern und Toxizität supprimieren kann (Chai et al., 1999; Jana et al., 2000; Wyttenbach et al., 2002). CHIP kann Zytotoxizität von  $\alpha$ -Synuklein und PolyQ-assoziierten Proteinen supprimieren, wahrscheinlich durch eine verstärkte Ubiquitinierung und Degradation monomerer oder oligomerer fehlgefalteter Spezies (Jana et al. 2005; Tetzlaff et al., 2008), auch erhöht eine Überexpression von CHIP die Zellviabilität und beschleunigt den Abbau von A $\beta$  und  $\tau$  (Kumar et al., 2007; Shimura et al., 2004). Hsp110, Chaperon und Nukleotidaustauschfaktor von Hsp70, interagiert mit der mutierten Form der SOD1 und supprimiert deren Aggregation (Yamashita et al., 2007; Wang et al., 2009), ebenso die der expandierten Form des Androgenrezeptors (Ishihara et al., 2003).

Auch das Chaperonin TRiC wurde mit entsprechenden neurodegenerativen Amyloidosen assoziiert. TRiC colokalisiert nicht nur mit Htt-Aggregaten (Behrends et al., 2006; Kitamura et al., 2006), sondern expandiertes Htt wurde auch unabhängig in mehreren Studien als TRiC-Substrat identifiziert (Behrends et al., 2006, Kitamura et al., 2006; Tam et al., 2006). Es wurde zudem festgestellt, dass ein optimaler Schutz der Zelle vor den fehlgefalteten Proteinen und Aggregaten neurodegenerativer Erkrankungen durch TRiC im Konzert mit dem Hsp70-System stattfinden kann (Behrends et al., 2006). Die Kombination

dieser beiden Systeme kann dabei früh während des Aggregationsprozesses toxische 200-kDa-Oligomere (A11-reakтив und toxisch) in benigne 500 kDa-Oligomere umwandeln (Behrends et al., 2006). Andere Chaperone, wie z.B. Hsp104 können ebenfalls im Zusammenspiel mit dem Hsp70/Hsp40-System bereits vorhandene Aggregate teilweise solubilisieren (Glover und Lindquist, 1998). Auch Hsp90 werden positive Effekte auf die Aggregation bzw. Toxizität von aggregierenden amyloiden Proteinen zugeschrieben, so wurde z.B. gezeigt, dass Hsp90 direkt mit dem Protein  $\tau$  assoziieren kann, und eine Induktion von Hsp70 und Hsp90 führte zu einer Reduktion der  $\tau$ -Aggregation (Dou et al., 2003).

Eine zweite wichtige zelluläre Abwehrmöglichkeit gegen die toxischen Einflüsse aggregierender und insbesondere amyloider Proteine besteht in der Degradation fehlgefalteter Proteine durch das UPS (Ross und Pickart, 2004; s. auch 2.4). In Aggregaten und Einschlussverbindungen wurden Bestandteile des UPS nachgewiesen, ebenso eine Ubiquitinierung der aggregierenden Proteine (Sherman und Goldberg, 2001). Wie bereits beschrieben sind verschiedene Adaptermoleküle an der Erkennung der fehlgefalteten Protein beteiligt, eine besonders zentrale Rolle spielt hier CHIP. Wird die Produktion von abnormalen Proteinen gestoppt und das Degradationssystem ist noch aktiv, so wurde nachgewiesen, dass unter diesen Bedingungen in Bakterien und Neuronen die Ansammlungen dieser fehlgefalteten Proteine durch das UPS eliminiert werden kann (Prouty und Goldberg, 1972; Yamamoto et al., 2000). Während der Akkumulation der abnormalen Proteine werden diese, wie auch in Abb. 2.6 dargestellt, häufig am Zentrosom, bzw. den Zentriolen gefunden, da die fehlgefalteten Proteine durch Mikrotubuli in einem retrograden Transport an diesen zentralen Ort transportiert werden können. Als amorphe Strukturen werden diese Körper auch als „Aggresomen“ bezeichnet (Johnston et al., 1998). Die Lewy-Körper, welche bei *M. Parkinson* auftreten, sind diesen Aggresomen sehr ähnlich (Olanow et al., 2004; Iwata et al., 2005) und beinhalten auch für das Zentrosom spezifische Markerproteine, nämlich  $\gamma$ -Tubulin und Perizentrin, daneben jedoch auch Ubiquitin-aktivierende Enzyme und Markerproteine der Autophagie. Damit stellen Lewy-Körper und Aggresomen im Allgemeinen wahrscheinlich das Endprodukt bzw. den Endpunkt der Aggregation dar, um die nicht abbaubaren Proteine an einer bestimmten Stelle zu lagern. Nach der Feststellung, dass es in mammalischen Zellen häufig zur Bildung eines Aggresomes kommt, wurde in Hefe nachgewiesen, dass bestimmte fehlgefaltete Proteine unter bestimmten Temperaturbedingungen in zwei unterschiedlichen Subkompartimenten lokalisiert sind. Während die fehlgefalteten Proteine im juxtanukleären Qualitätskontroll-Kompartiment (JUNQ) relativ löslich und mit hoher proteasomaler Konzentration umgeben sind, verhalten sich die abnorm gefalteten Proteine im zweiten

Subkompartiment, dem perivakuolären IPOD (insoluble protein deposit), gegensätzlich. Hier sind sie relativ immobil und unlöslich und werden bevorzugt bei Blockade des UPS dorthin dirigiert, wobei sie hier eventuell über den Prozess der Autophagie eliminiert werden können (Kaganovich et al., 2008). Wahrscheinlich entspricht der analysierte IPOD in der Hefe dem Aggresom in mammalischen Zellen, denn auch dieses kann *via* Makroautophagie eliminiert werden, welche als Bestandteil des dritten wichtigen Mechanismus für die Eliminierung von fehlgefalteten Proteinen sorgen kann. So wurde z.B. auch berichtet, dass akkumuliertes expandiertes Htt in Strukturen akkumuliert, welche viele Charakteristika von Autophagosomen aufweisen (Iwata et al., 2005; Levine, 2005; Rideout et al., 2004). Als eine vierte wichtige Hilfe gegen die toxischen Einflüsse aberrant gefalteter Proteine werden auch die Einschlussverbindungen oder Inklusionen selbst angesehen, wobei, wie erwähnt, auch wichtige zelluläre Komponenten in diesen sequestriert und damit ihrer Funktion entzogen werden können. Sowohl bei *M. Alzheimer* (Terry et al., 1991) als auch bei *M. Parkinson* (Tompkins und Hill, 1997) war die Korrelation zwischen dem Auftreten von Einschlusskörpern (amyloiden Plaques im Fall von *M. Alzheimer*, Lewy-Körpern im Fall von *M. Parkinson*) und Zytotoxizität gering, ebenso wie in *C. Huntington* (Gutekunst et al., 1999, Arrasate et al., 2004).

Zusammenfassend zeigt sich folgendes Bild der zellulären Verteidigungsstrategie gegen fehlfaltende und daraufhin aggregierende Proteine: Zuerst wird versucht mit Hilfe molekularer Chaperone die Proteine in ihre native Konformation zurückzufalten. Gelingt dies nicht, so werden die fehlgefalteten Proteine degradiert, wahrscheinlich zuerst über das UPS. Gelingt auch dies nicht, weil z.B. die Aggregate bereits zu groß sind und/oder das UPS überlastet ist, wird weiterhin versucht die Degradation über Autophagie, meistens über Makroautophagie bei größeren Aggregaten, jedoch auch über CMA bei fehlgefalteten Proteinen, zu bewerkstelligen. Schlägt auch diese Strategie fehl, so legt die Zelle die fehlgefalteten Proteine bevorzugt an einem Ort „auf Halde“, wo sie möglichst wenig Schaden anrichten können. Wird die Zelle dadurch noch zu sehr geschädigt und es brechen essentielle zelluläre Funktionen zusammen, kann die Zelle das gezielte Selbstmordprogramm, die Apoptose, einleiten, um möglicherweise umliegende Zellen oder Gewebe zu schützen (Raynaud und Marcilhac, 2006; Hickey und Chesselet, 2003).

Die bestehenden zellulären Abwehrsysteme gegen aggregierende, amyloide Proteine und damit gegen Amyloidosen werden versucht in anthropogener Weise zu modifizieren, so dass möglicherweise ein besserer Schutz vor diesen erblichen Krankheiten gewährleistet werden kann. Es gab zahlreiche Versuche, auf Ebene der molekularen Chaperone, des UPS und der

Autophagie in die zelluläre Homöostase einzugreifen und durch z.B. eine Induktion der betreffenden Komponenten eine Verminderung der Toxizität zu erreichen. Es gab Studien mit Geldanamycin und seinen Derivaten, welche Hsp90 inhibieren und dadurch HSF-1 stimulieren, so dass dadurch die Expression verschiedener anderer molekularer Chaperone induziert wird (Westerheide und Morimoto, 2005). Verschiedene Inhibitoren des Hsp90 wirkten erfolgreich gegen Aggregation und Zytotoxizität durch Induktion anderer Chaperone bei verschiedenen Modellen neurodegenerativer Amyloidosen (Auluck et al., 2002; Sittler et al., 2001; Waza et al., 2005). Andererseits sind schwere unerwünschte Wechselwirkungen zu erwarten, da diese Substanzen Hsp90 inhibieren; Induktion der HSR mit anderen niedermolekularen Substanzen wie Celastrol oder dem proteasomalen Inhibitor MG132 könnte daher einen anderen vielversprechenden Ansatz liefern (Mu et al., 2008).

Auch das UPS ist Ansatzpunkt für eine mögliches Eingreifen auf molekularer Ebene gegen fehlfaltende Proteine. Durch proteasomale Inhibitoren wird nicht nur die HSR induziert (Lee und Goldberg, 1998), sondern auch mehr Proteasomen synthetisiert (Meiners et al. 2003). Mit Bortezomib steht ein bereits zugelassenes Arzneimittel für die Inhibition des Proteasoms zur Verfügung, indiziert für die Therapie des multiplen Myeloms (Hideshima et al., 2001), wobei jedoch Bortezomib eventuell ebenfalls protektiv vor Amyloidosen wirkt (Nawrocki et al., 2006).

Ähnliche Strategien stehen auch bei der Induktion der Autophagie im Vordergrund, wobei Aggregate aus expandiertem Htt im Tiermodell und aus  $\alpha$ -Synuklein in der Zellkultur durch Induktion der Autophagie abgebaut wurden (Rubinsztein et al., 2005).

## 2.6 Experimentelle Modelle

### 2.6.1 *De novo* generierte amyloide Proteine

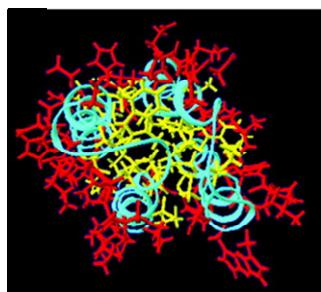
Viele neurodegenerative Amyloidosen sind, wie beschrieben unter 2.5.1, durch zytotoxische Einflüsse auf bestimmte Neuronen oder neuronale Zellen charakterisiert. Dabei wird angenommen, dass die Zytotoxizität zum großen Teil aus einer Funktionsverstärkung durch das fehlgefaltete Protein selbst resultiert, weniger aus einem Verlust seiner Funktion bedingt durch die Fehlfaltung (Stefani und Dobson, 2003; Winklhofer et al., 2008). Um diese beiden Effekte zu unterscheiden, bedarf es Proteine, welche im zellulären Geschehen durch Aggregation keine Funktionsstörung ihrer selbst auslösen. Es sollten also Proteine untersucht werden, die keine biologische Funktion besitzen, jedoch charakteristische Merkmale der neurodegenerativen Amyloidosen verursachenden Proteine aufweisen, nämlich aggregieren,

amyloide Strukturen bilden und Zytotoxizität verursachen. Natürliche, in Zellen exprimierte Proteine scheiden damit für eine Analyse dieser Art aus, da sie eine biologische Funktion besitzen bzw. durch die Evolution bedingt Interaktionen mit anderen Proteinen aufweisen. Artifiziell hergestellte Proteine, welche die oben genannten Bedingungen erfüllen, sollten für eine Analyse zytotoxischer Eigenschaften amyloider, aggregierender Proteine in Frage kommen.

Tatsächlich wurden *de novo* generierte, artifizielle Proteine mit amyloiden Eigenschaften mittels einer kombinatorischen Bibliothek hergestellt und *in vitro* charakterisiert, wobei sich herausstellte, dass diese Proteine aggregierten, Kongorot banden, in der CD-Spektroskopie einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern zeigten und im Elektronenmikroskop Fibrillen sichtbar wurden (West et al., 1999).

Diese Bibliothek ist Teil eines größeren Projektes, in welchem *de novo* generierte Proteine verschiedener Art erstellt wurden. Dabei wurden, ausgehend von der sogenannten „Binärkode-Hypothese“, nach dem Vorbild natürlicher Proteine artifizielle Proteine erstellt. Zwei mit der Faltung bei natürlichen Proteinen zusammenhängende Themen wurden dabei aufgegriffen: (1) Sie beinhalten fast alle die Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt und (2) sie exponieren polare, hydrophile As-Reste in das umgebende wässrige Milieu und halten die meisten unpolaren, hydrophoben As-Reste im Kern der Proteine verborgen. Ausgehend von der Binärkode-Hypothese sollte durch eine Periodizität der Sequenz von polaren und apolaren As-Resten die repetitiven Elemente von Sekundärstrukturelementen natürlicher Proteine imitiert werden (Xiong et al., 1995). Das bedeutet, um ein  $\alpha$ -helikales Protein zu entwerfen, muss die Periodizität der As-Sequenz mit polaren und apolaren As-Resten die strukturelle Wiederholung von 3,6 As-Resten pro Windung der Helix aufweisen. Danach besitzt beispielsweise eine Sequenz aus polaren (○) und apolaren (●) Resten mit dem Verteilungsmuster ○●○○●●○○●○○●○ eine apolare As in jeder dritten oder vierten Position, was den Wiederholungen in einer  $\alpha$ -Helix entsprechen würde. Dagegen würde eine Sequenz mit dem alternierenden Muster ○●○●○●○ eine Periodizität ihrer Sequenz von zwei aufweisen, was mit der Struktur eines  $\beta$ -Stranges übereinstimmt, wobei die As-Reste wechselseitig nach oben und nach unten weisen. Dabei spielt die individuelle As an der jeweiligen Position für polar oder apolar keine Rolle, wichtig ist nur, dass sie dem Muster polar oder apolar an der spezifischen Position des Proteins entspricht. Da die präzise Identität eines jeden polaren oder apolaren Restes nicht näher spezifiziert wird, können durch diese Binärkode-Strategie Proteinbibliotheken mit einer hohen kombinatorischen Diversität hergestellt werden.

Dies wurde für  $\alpha$ -helikale Proteine und  $\beta$ -Faltblatt-Proteine durchgeführt. Dabei wurde zunächst über diese Strategie eine Proteinbibliothek von 4-Helix-Bündel-Proteinen mit 74 As-Resten *de novo* generiert und in Bakterien exprimiert. Es zeigte sich, dass diese Proteine löslich und monomer waren und in der CD-Spektroskopie einen hohen Anteil  $\alpha$ -Helices aufwiesen (Kamtekar et al., 1993). Jedoch zeigte es sich in NMR- und massenspektrometrischen Studien, dass viele dieser kurzen *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteine fluktuierende Strukturen aufwiesen (Roy et al., 1997; Rosenbaum et al., 1999; Roy und Hecht, 2000). Es wurde eine zweite Bibliothek von 4-Helix-Bündel-Proteinen generiert, wobei die individuellen *de novo* Proteine hier diesmal 102 As-Reste umfassten (Wei et al., 2003b). Diese Proteine, ausgehend vom Protein n86 der Bibliothek von Kamtekar et al., 2003, erwiesen sich in NMR-Studien als stabiler und mit wohldefinierter, nativ-ähnlicher, wenig fluktuierender Gestalt (Wei et al., 2003a; Go et al., 2008).



**Abb. 2.7: NMR-Struktur des 4-Helix-Bündel-Proteins S824 aus der 2. Generation der *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteine.** Es ist der Blick von oben auf das  $\alpha$ -helikale Protein gezeigt, wobei die apolaren Reste (gelb) im Inneren des Proteins liegen und die polaren Reste (rot) außen. Die Strukturen der vier  $\alpha$ -Helices werden durch blaue Spiralen repräsentiert (Wei et al., 2003b).

Es wurden sowohl das Protein S824 als auch S836 aus der 2. Generation mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Der Vergleich zeigte, dass beide Proteine sehr ähnlich wie in Abb. 2.7 aufgebaut sind und stabile 4-Helix-Bündel-Proteine bildeten. Dennoch wurde festgestellt, dass das  $\alpha$ -helikale Protein S824 etwas dichter gepackt ist, weniger Kavitäten aufweist und sich bei den NMR-Analysen etwas weniger dynamisch, fluktuierend als S836 verhielt (Go et al., 2008). Die *de novo* generierten  $\alpha$ -helikalen Proteine wurden bei der vorliegenden Arbeit als Kontrollproteine im Vergleich zu den *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen herangezogen.

Es wurden auch, wie erwähnt, Bibliotheken mit *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen generiert, wobei erneut die Binärkode-Strategie gewählt wurde (West et al., 1999). Alle Sequenzen der Bibliotheken wurden im ○●○●○●○-Muster hergestellt, was mit der amphiphilen  $\beta$ -Struktur übereinstimmt. Die präzisen Identitäten der As-Reste wurden nicht limitiert, sondern kombinatorisch variiert. Für die polaren Reste wurde das degenerierte Codon XAX zugelassen (X: variable Basen), dies codiert für folgende Aminosäuren: Y, H, Q, N, K, D und E. Für die apolaren Reste war das degenerierte Codon XTX erlaubt (X: variable Basen), dies codiert für die Aminosäuren F, I, L, V und M als Startcodon. Für die Turns wurde das degenerierte Codon RRT zugelassen (R repräsentiert die Basen A oder G), dies codiert für die

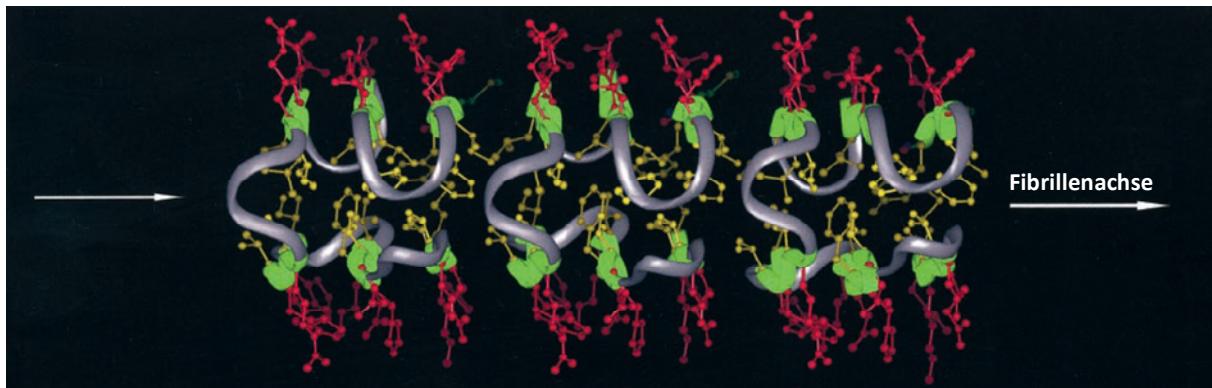
Aminosäuren G, N, E oder S; P wurde im mittleren Turn an Position 2 eingefügt. Dies bedeutet, dass folgende Aminosäuren aus dem Design ausgeschlossen wurden: T, A, C, W; diese Aminosäuren fehlen den Proteinen der Bibliothek. Die auf diese Weise designten  $\beta$ -Faltblattproteine wurden von der Bibliothek mit synthetischen Genen in Bakterien exprimiert, und einige von ihnen wurden gereinigt und näher charakterisiert. Dabei zeigte es sich, dass die Proteine der Bibliothek mit den Nummern #4, #17 und #23, welche nachfolgend auf Grund ihrer  $\beta$ -Struktur als  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 bezeichnet werden sollen, *in vitro* aggregierten, Kongorot banden,  $\beta$ -Faltblattstruktur aufwiesen, in Fibrillen polymerisierten (wobei bei  $\beta$ 23 auch amorphe Aggregate in den elektronenmikroskopischen Bildern zu sehen sind) und eine thermisch induzierte partielle Disassemblierung durchlaufen konnten (West et al., 1999; Schema des Designs s. Abb. 2.8). Obwohl viele Charakteristika amyloider Proteine auch bei diesen artifiziellen Proteinen nachgewiesen wurden, sollten sie als amyloid-ähnlich bezeichnet werden; im Folgenden wird die genauere Bezeichnung dieser artifiziellen Proteine als „*de novo*“ generierte amyloid-ähnliche Proteine vereinfachend durch „*de novo*“ amyloide Proteine“ oder „*de novo*“  $\beta$ -Faltblatt-Proteine“ ersetzt.



**Abb. 2.8.: Schema des Designs einer kombinatorischen Bibliothek von *de novo*  $\beta$ -Faltblatt-Proteinen.** Die artifiziell hergestellten Proteine umfassen sechs  $\beta$ -Stange, bestehend aus je sieben As mit dem alternierenden Muster polar (○) – apolar (●). Diese sind durch finf Turns aus vier As verbunden, wobei kombinatorische Diversität in den polaren/apolaren As-Resten und den Turns ohne nähere Spezifikation (t) erhalten wird. Fixe As-Positionen bestehen am N-Terminus, am C-Terminus, sowie in einigen Turns (aus West et al., 1999).

Die  $\alpha$ -helikalen Proteine und die  $\beta$ -Faltblatt-Proteine weisen einen großen Unterschied auf: Während die Sequenzen der  $\alpha$ -helikalen Proteine intramolekular in globuläre Strukturen falteten, assemblieren und aggregieren die  $\beta$ -Faltblattproteine intermolekular in höhere Oligomere und schließlich amyloide Fibrillen, obwohl die Länge der beiden Proteine mit 63-As-Resten für die *de novo* amyloiden Proteine und 102-As-Resten für die *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteine in beiden Fällen gering ist. Es ist wahrscheinlich das binäre Muster der As-Abfolge, welches diesen großen Effekt auf die Faltung der artifiziellen Proteine ausmacht.

Bis jetzt ist es noch nicht gelungen, die Struktur der *de novo* amyloiden Proteine zu lösen, so dass man auf 3D-Computermodelle zurückgreifen muss. In Abb. 2.9 ist ein solches Computermodell der amyloiden *de novo* Proteine gezeigt. Daraus geht hervor, dass die polaren Reste nach außen weisen, wo sie mit der umgebenden polaren Flüssigkeit in Kontakt treten, während die apolaren Reste im Inneren des Monomers liegen, ähnlich der Anordnung in natürlich vorkommenden Proteinen (Wang und Hecht, 2002).



**Abb. 2.9: 3D-Modell der amyloiden *de novo* Proteine.** Die  $\beta$ -Stränge sind grün dargestellt, polare, nach außen weisende As rot, apolare As-Reste gelb, sind im Inneren des artifiziellen Proteins angeordnet, die Turns, bestehend aus vier Aminosäuren, sind grau dargestellt. Es wird nach diesem Modell deutlich, dass die hydrophoben As am Rand des Monomers in Kontakt mit der umgebenden wässrigen Lösung kommen, so dass der hydrophobe Effekt hier wahrscheinlich zur Oligomerisierung führt, um diese Kontakte zu unterbinden bzw. die hydrophobe Oberfläche mit Zugang zur umgebenden Lösung möglichst gering zu halten. Dieses führt vermutlich in der durch weiße Pfeile angegebenen Richtung zur beobachteten Bildung amyloider Fibrillen (nach Wang und Hecht, 2002).

Die Sequenzen von amyloiden *de novo* Proteinen wurden, ausgehend von diesem Modell und verschiedenen anderen Hypothesen über die Rolle der sich am Rande eines Monomers befindenen As (Richardson und Richardson, 2002), verändert, so dass in der Mitte des ersten und letzten  $\beta$ -Stranges anstatt einer apolaren As nun Lysin substituiert wurde:  $\circ \bullet \circ K \circ \bullet \circ$ . Die Anwesenheit von Lysin in der apolaren Region der Proteine sollte die Bildung von Fibrillen unterbinden, da solche Strukturen wasserlöslicher wären und sich außerdem aufgrund der gleich geladenen As abstoßen würden. Eine Charakterisierung einiger dieser Mutanten *in vitro* zeigte, dass sie nun tatsächlich in monomerer Form vorlagen (Wang und Hecht, 2002). Wenn es wirklich stimmt, dass alternierende Sequenzen von polaren und apolaren As eine immanente Aggregationstendenz in amyloide Strukturen aufweisen, dann sollte diese Abfolge in den natürlich vorkommenden Proteinen nicht begünstigt sein. Eine *in silico*-Analyse von 250.514 natürlichen Proteinen ergab, dass die berechneten Frequenzen alternierender Muster relativ zu anderen Mustern mit ähnlicher Zusammensetzung in niedrigerem Prozentsatz vorlagen (Broome und Hecht, 2000). Diese Unterrepräsentation alternierender polarer und apolarer As in natürlichen Proteinen, verbunden mit der Beobachtung, dass die artifiziell generierten *de novo*  $\beta$ -Faltblatt-Proteine amyloide Strukturen ausbilden, legen nahe, dass diese Sequenzen während der Evolution vermieden wurden, wo immer es möglich war. Zusammenfassend boten sich die *de novo* generierten  $\beta$ -Faltblattproteine mit ihren *in vitro* amyloiden Eigenschaften als Modellproteine für die Analyse der Aggregation, verknüpft mit Zytotoxizität *in vivo*, mit den *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteinen als Kontrolle, an.

## 2.6.2 Proteinfehlfaltung durch nicht-kanonische Aminosäuren

Proteine bestehen, wie bereits unter 2.1 beschrieben, aus 20 proteinogenen oder kanonischen Aminosäuren (As), manchmal werden Selenocystein oder Pyrrolysin als 21. und 22. kanonische As beschrieben. Daneben gibt es nicht-kanonische oder nicht-proteinogene As, die nicht mit Hilfe von genetischen Codons ihren Platz finden und daher nicht in Proteine inkorporiert werden sollten. Ihre Funktion liegt in der Speicherung von Stickstoff oder als Giftstoff gegen Pflanzen oder Fressfeinde (Rubenstein, 2000). Zudem werden immer mehr nicht-proteinogene As im Labor synthetisiert (Hartman et al., 2007).

Einige strukturelle As-Analoga können die zellulären Mechanismen zur Erkennung von proteinogenen As aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit diesen umgehen und in die Polypeptidkette durch Translation missinkorporiert werden, wie es zuerst bei bakterieller Proteinbiosynthese beschrieben wurde (Richmond, 1962). Aminosäureanaloga in Pflanzen wurden als antimikrobiell und insektizid beschrieben (Rehr et al., 1973; Rosenthal, 1976).

Die Selektion der korrekten As durch die Aminoacyl-tRNS-Synthetasen stellt eine Schlüsselfunktion bei der Vermeidung von Fehlern in der Proteinsynthese dar. Beim Korrekturlesen werden inkorrekte As auf Grund ihrer Größe oder ihrer Unfähigkeit, distinkte Bindungen mit der Aminoacyl-tRNS-Synthetase auszubilden, erkannt. Ein As-Analogon, welches jedoch eine ähnliche Größe oder Form besitzt und ähnliche Bindungen eingeht wie ihr proteinogenes Derivat, kann fälschlicherweise an die entsprechende tRNS gebunden und in die wachsende Polypeptidkette (miss-) inkorporiert werden (Richmond, 1962). Ein entsprechendes zweites Korrekturlesen auf ribosomaler Ebene scheint es nicht zu geben.

Die As-Analoga im Beisein ihrer proteinogenen Derivate werden zufällig an deren Stellen in die naszierende Polypeptidkette eingebaut (Richmond, 1962). Dies bedeutet, dass in *in vivo*-Systemen der Translationsapparat mit einem Gemisch aus proteinogener As und Aminosäureanalogen konfrontiert wird, wobei das Verhältnis dieser beiden As durch die Eintrittsrate des As-Analogons und damit seiner intrazellulären Konzentration bestimmt wird, sowie über das Vorhandensein der proteinogenen As durch Degradation oder endogene Syntheserate. Studien über As-Analoga zeigten, dass diese meistens durch die gleichen Transporter in die Zellen transloziert werden wie die proteinogenen As, jedoch häufig mit geringerer Affinität für den Transporter (Cowie et al, 1959).

As-Analoga wurden in Samen, Früchten, Hülsen und Nüssen von Pflanzen nachgewiesen, werden dabei auch vom menschlichen Körper aufgenommen und in Zellen transportiert, wobei sie meistens, dosisabhängig, nicht toxisch für den Menschen sind. Es gibt

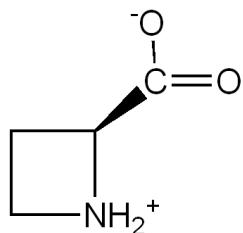
jedoch Anzeichen, dass gewisse As-Analoga auch in die Proteine von *Mammalia* missinkorporiert werden können und eventuell autoimmun-ähnliche Symptome hervorrufen (Bell et al., 2003; Rubenstein, 2000). Daneben haben synthetisch hergestellte As-Analoga wie z. B. L-DOPA heute therapeutischen Nutzen.

Es wurden einige Versuche durchgeführt, die bewiesen, dass anomale Proteine durch die Missinkorporation von As-Analoga in Zellen generiert wurden. Es wurde dabei demonstriert, dass diese nicht-nativen Proteine schneller degradiert werden als die nativen Proteine in Bakterien (Prouty et al., 1975) und humanen Zellen (Dean und Riley, 1978). Zudem zeigten Prouty et al. 1975, dass das sehr schnelle Auftreten von abnormen Proteinen zur Bildung „zytosolischer Granula“ führte. Diese intrazellulären Granula wurden auch als Aggregate beschrieben, waren nicht membrangebunden, resistent gegenüber vielen Detergenzien, enthielten denaturierte Proteine und die Autoren schlugen vor, dass dies einen protektiven Mechanismus darstellen könnte. Damit fassten sie bereits einige Eigenschaften aggregierender Proteine zusammen. Das schnelle Auftreten dieser fehlgefalteten Spezies könnte die Chaperon-Kapazitäten der Zelle übersteigen, was in der Generierung von Proteinaggregaten mündet. Diese Inkorporation könnte daher als Beispiel dienen um zu analysieren, welche molekularen Chaperone für eine Protektion von Zellen gegen die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen benötigt werden, in Analogie zu degenerativen Krankheiten.

Proteine mit inkorporierten As-Analoga waren weniger resistent gegenüber Degradation (Bradley et al., 1976; Dean und Riley, 1978), wahrscheinlich resultierte dies daraus, dass die As-Analoga eine partielle Denaturierung der veränderten Proteine begünstigten, indem sonst im Protein verborgene As zugänglicher für proteolytische Spaltung werden, anders als bei nativ gefalteten Proteinen. Ferner wurde gezeigt, dass jüngere Fibroblasten Proteine mit inkorporierten As-Analoga effizienter degradieren als ältere Fibroblasten (Bradley et al., 1976) und es wurde bereits damals die Hypothese aufgestellt, dass senescente Zellen wahrscheinlich einen partiellen Defekt in ihren Degradationssystem entwickeln und die Fähigkeit verlieren, aberrante Proteine zu katabolisieren, was zu einer erhöhten Menge anomaler Proteine und derangierten Zelfunktionen führt. Es wurde zudem entdeckt, dass ATP beim Umsatz von As-Analoga enthaltenden Proteinen eine Schlüsselrolle einnimmt (Etlinger und Goldberg, 1977), dieser Befund gab bereits einen Hinweis auf das 26S-Proteasom als primäre zelluläre Degradationsmaschinerie.

Wichtige As-Analoga, auf welche auch häufig bei *in-vitro*-Studien zurückgegriffen wird, sind L-Canavanin, ein As-Analogon von L-Arginin, und L-Azetidin-2-carbonsäure, ein

Analogon von L-Prolin. L-Azetidin-2-carbonsäure (Azc) ist eine nicht-kanonische  $\alpha$ -Aminosäure, die sich von ihrer proteinogenen Aminosäure L-Prolin nur durch Ringverkleinerung um eine Methylengruppe unterscheidet (s. Abb. 2.10). Sie ist ein toxischer Bestandteil der Rhizome von Maiglöckchen (*Convallaria majalis*) und wirkt hemmend auf Pflanzenwachstum (Fowden und Bryant, 1959). L-Azc kann L-Prolin während der Proteinbiosynthese substituieren und in Proteine inkorporiert werden (Bradley et al., 1976; Knowles und Ballard, 1978). Die strukturellen Unterschiede von Azc zu Prolin resultieren in Änderungen des Torsionswinkels, der Richtung von Turns in Proteinen und einer veränderten cis-trans-Isomerisierung, so dass die Substitution von Azc für Prolin auf diese Weise die Proteinstruktur und Funktion ändern kann (Tsai et al., 1990; Baeza et al., 2008). Da Kollagen zu hohem Anteil aus Prolin besteht, reagiert es sehr sensitiv gegenüber der Behandlung mit Azc, so dass ein Defekt des funktionellen Kollagens ein wichtiges Merkmal von Azc-Substitutionen darstellt (Zagari et al., 1994). Wird Azc im Tierversuch an Hühner verfüttert, so führt diese Administration zu einer Deformation der Extremitäten bei deren Embryonen (Mauger et al., 1983).



**Abb. 2.10: Struktur der L-Azetidin-2-carbonsäure, einem As-Analogon von L-Prolin.** Azc besteht aus einem heterozyklischen, viergliedrigen Ring mit Stickstoff als Heteroatom (Azetidin), dieser ist mit einer Carbonsäuregruppe am vicinalen Kohlenstoffatom substituiert. Der Unterschied zu L-Prolin ist das Fehlen einer Methylengruppe im Ring des Azc. Azc kann als ein As-Analogon statt L-Prolin in Proteine missinkorporiert werden.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Missinkorporation von Azc in Proteine ihre thermische Stabilität beeinträchtigen und Proteinfaltungsfehlfaltung auslösen kann (Lane et al., 1971; Zagari et al., 1994). Es liegt daher nahe, dass diese fehlgefalteten Proteine durch Chaperone erkannt werden, und nach Azc Inkubation wurde festgestellt, dass die solchermaßen aberranten Proteine tatsächlich Hsp70/Hsc70 *in vivo* binden (Beckmann et al., 1990). Azc ist auch in der Lage, reversibel die Proliferation von knospenden Hefezellen zu inhibieren, wobei ein Arrest des Zellzyklus nach ein bis zwei Generationen in der G1-Phase festgestellt wurde (Trotter et al., 2001).

Zusammengenommen stellen nicht-proteinogene As, insbesondere L-Canavanin und Azc, wichtige As-Analoga für die Untersuchung von fehlgefalteten Proteinen dar. Es wurde bis jetzt jedoch noch nicht untersucht, welcher Natur diese fehlgefalteten Proteine sind, in welcher Weise sie aggregieren, und ob die Aggregate amyloiden Charakter haben. Interessant wäre auch, inwieweit eine durch ein As-Analogon hervorgerufene Zytotoxizität durch den Einsatz von proteasomalen und eventuell autophagealen Inhibitoren verstärkt werden könnte, da die toxischen Spezies nicht mehr degradiert werden könnten und akkumulierten. Auch die

Untersuchung der toxischen Moleküle selbst wäre interessant, einerseits um welche Proteine es sich dabei handelt, und andererseits, welche allgemeine Formen diese fehlgefalteten Proteine dabei annehmen können.

Daher wurde mit Azc in Kombination mit einem proteasomlaen Inhibitor in HEK293T-Zellen modellhaft versucht darzustellen, ob exogen durch Azc als As-Analogon von Prolin hervorgerufene Fehlfaltung von endogenen Proteinen durch proteasomale Inhibitoren verstärkt wird und amyloide Spezies und Intermediate (Oligomere) durch eine Inhibition der proteasomalen Degradation verstärkt akkumulieren.

### **2.6.3 Modifiziertes Huntington-Exon 1 als Modellsystem für neurodegenerative Amyloidosen**

Die Huntington-Krankheit, auch als *Chorea Huntington*, *Chorea major* oder Veitstanz bezeichnet, ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, die sich meistens mit dem 4. Lebensjahrzehnt zu manifestieren beginnt. Sie wurde zuerst 1872 von George Huntington (Huntington, 1872) als eine klinische Trias beschrieben: 1. Erblich, 2. Bewegungsstörungen und psychische Symptome, 3. schwere Symptome nur im Erwachsenenalter (dieses Kriterium stellte sich später als falsch heraus). Die Krankheit führt im Durchschnitt 15 Jahre nach dem ersten Auftreten der Symptome zum Tod, wobei homozygote Mutationsträger nicht stärker betroffen sind als heterozygote und beide mit vollständiger Penetranz erkranken; die Inzidenz in Europa und Nordamerika liegt bei ca. 1:20.000. Neben psychischen Beschwerden, welche sich gewöhnlich 10 bis 20 Jahre vor dem Auftreten der choreiformen Bewegungen bemerkbar machen (Craufurd et al., 2001), treten Hyperkinesien auf, welche als charakteristisch für *C. Huntington* angesehen werden (Folstein et al., 1986). Nachfolgend kommt es zur Erhöhung des Muskeltonus, sowie Gedächtnisverlust, mit einem über 15 bis 20 Jahre langem Verlauf, welcher mit dem Tod endet.

Bis heute können Symptome der Krankheit nur palliativ gemindert werden, eine Kuration der Krankheit selbst ist bisher nicht gelungen. Ein vielversprechender Ansatz könnte eine Induktion von molekularen Chaperonen sein, um möglicherweise Fehlfaltungen aufzuhalten und ein Absterben von Neuronen zumindest zu verlangsamen. Eine Studie im Zellkulturmodell, bei welchem durch den Einsatz von Geldanamycin die Aggregation von Htt inhibiert wurde, könnte einen Ansatzpunkt darstellen (Sittler et al., 2001). Neben der Entwicklung und Analyse von membangängigen Pharmaka (Schiffer et al., 2007) könnte

irgendwann auch die Stammzelltherapie das Absterben der Neuronen kompensieren (Clelland et al., 2008).

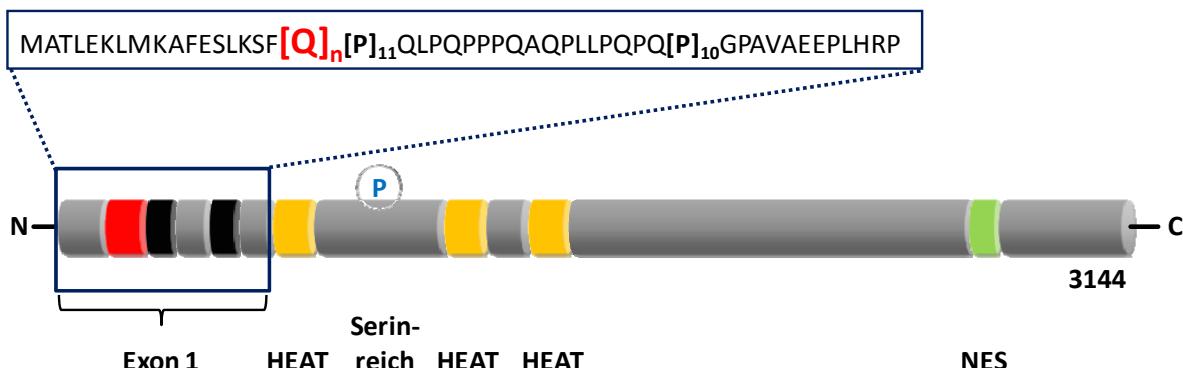
Das *C. Huntington* verursachende Protein Huntingtin (Htt) umfasst in der nicht-pathogenen Form 3144 Aminosäuren, was einem ca. 350 kDa schweren Protein entspricht. Es wird ubiquitär in geringen Mengen exprimiert, den höchsten Expressionsgrad weist jedoch das Gehirn auf (DiFiglia et al., 1995; Gutekunst et al., 1995; Sharp et al., 1995; Li et al., 1993). Innerhalb des Gehirns wurden der zerebrale *Cortex*, das *Striatum* und der *Hippocampus* als die Substrukturen identifiziert, in welchen Htt die höchsten Expressionslevel aufweist. Diese Regionen stimmen nur teilweise mit dem am stärksten von der Neurodegeneration betroffenen Gehirnarealen, dem *Striatum*, überein (Sharp et al., 1995). Innerhalb des Gehirns, und besonders des *Striatums*, ist Htt hauptsächlich in Neuronen nachweisbar, jedoch auch schwach in Gliazellen (Strong et al., 1993). Innerhalb der Neuronen wird Htt vor allem im Soma exprimiert, es wurde jedoch auch im Nukleus, in Neuriten (DiFiglia et al., 1995) und Synapsen gefunden. Htt assoziiert auch mit anderen Kompartimenten der Zelle, z.B. Endosomen, Mitochondrien, Clathrin umhüllten Vesikeln sowie an der Zellmembran (DiFiglia et al., 1995; Hoogeveen et al., 1993; Gutekunst et al., 1994; Kegel et al., 2005).

Expandiertes Htt führt zur selektiven Dysfunktion und zum Zelltod neuronaler Subpopulationen im Zentralnervensystem. Insbesondere die GABAerge Neuronen des *Striatums* und des *Subcortex*, welche Körperbewegungen kontrollieren, zeigen den degenerativen Verfall und charakteristische Aggregate (Vonsattel et al., 1985). Mit weiterem Verlauf der Erkrankung wird ein genereller Verlust von Neuronen in verschiedenen Gehirnregionen beobachtet.

Zur eigentlichen Funktion des Htts gibt es sehr viele Hypothesen. Studien belegen, dass die Expression von wt Htt zu einer verlängerten Überlebensrate von Hirnzellen und eine Depletion von wt Htt zur Ausprägung einiger Phänotypen von expandiertem Htt führte. Eine erhöhte Expression des wt Htt hatte eine antiapoptotische Wirkung auf neuronale Zellen zur Folge, welche zuvor toxischen Stimuli ausgesetzt worden waren (Rigamonti et al., 2000), verminderte Apoptose nach Expression von wt Htt wurde auch im Mausmodell demonstriert (Zhang et al., 2003). Auch eine erhöhte Transkriptionsrate vom Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und anderen Repressoren wird einer erhöhten Expression von wt Htt zugeschrieben (Zuccato et al., 2001; Zuccato et al., 2003). Viele Versuche wurden unternommen, um zu analysieren, welche Auswirkungen eine Reduzierung des wt Htts zur Folge haben würden. So wurde z.B. embryonale Lethalität in Hdh(-/-)-Mäusen nachgewiesen

(Nasir et al., 1995; Duyao et al., 1995); waren die Htt-Mengen in Mäusen um mehr als 50 % verringert, führte dies zu einer abnormalen Hirnentwicklung (White et al., 1997; Auerbach et al., 2001). Handelte es sich um Hdh(+-)-Mäuse, wurden Apoptose und neuronale Dysfunktion beobachtet (Dragatsis et al., 2000). Interaktionen wurden mit Hip1 und Hip2 (Huntingtin interacting protein) (Kalchmann et al., 1997; Wanker et al., 1997), Transkriptionsfaktoren und p53 (Schaffar et al., 2004; Steffan et al., 2000) nachgewiesen, auch für GAPDH wurden Interaktionen mit Htt gezeigt (Burke et al., 1996). Die genaue physiologische Funktion des Htt ist also noch nicht abschließend geklärt, doch weisen die Befunde insgesamt auf eine Rolle in Transkriptionsregulation, vesikulären Transport oder Signaltransduktion hin.

Die Ursache dieser genetisch bedingten Erkrankung ist eine Expansion einer repetitiven Poly-CAG Sequenz im Huntingtin-Gen auf dem Genlocus IT-15 des kurzen Arms von Chromosom 4 (Gusella et al., 1983). Das Huntingtin-Gen besteht aus 67 Exons, wobei die Poly-CAG-Sequenz im N-terminalen Exon 1 aus 6 – 39 Repetitionen besteht, die expandierte Form aus über 36 (Ambrose et al., 1994; Rubinsztein et al., 1996). Es wurde eine positive Korrelation der Länge der CAG-Sequenz und der Schwere der Symptome festgestellt, sowie eine inverse Beziehung von Länge der CAG-Sequenz und dem Alter der Manifestation der Symptome (Andrew et al., 1993).



**Abb. 2.11: Anordnung der Htt-Domänen.** Das gesamte Protein umfasst 3144 As in der nicht-pathogenen Form. Die **PolyQ-Sequenz**, welche in ihrer expandierten Form *C. Huntington* bedingt, ist rot dargestellt und liegt im Exon 1 des Htt. Prolinreiche Regionen sind schwarz unterlegt (fett unterlegt in der As-Sequenz des Exon 1) und **HEAT-Domänen** sind gelb dargestellt. Htt kann phosphoryliert werden (P) und beinhaltet eine **NES-Sequenz** (grün) und (nicht dargestellt) NLS-Sequenz (erstellt nach Truant et al., 2007).

Das Exon 1 des 67 Exons umspannenden Huntingtin-Gens beinhaltet die Poly-CAG-Sequenz, welche sich als PolyQ-Sequenz im Htt-Protein wiederfindet (Truant et al., 2007). *Mammalia* besitzen außerdem in Exon 1 prolinreiche Regionen (s. auch Abb. 2.11), welche neben der PolyQ-Sequenz auch Einfluss auf Aggregation und Zytotoxizität des Htt-Moleküls ausüben (Dehay und Bertolotti, 2006). Nahe des N-Terminus befinden sich in Htt drei HEAT-Motive, wobei HEAT unter anderem nach Htt benannt wurde: HEAT steht für „gefunden in den

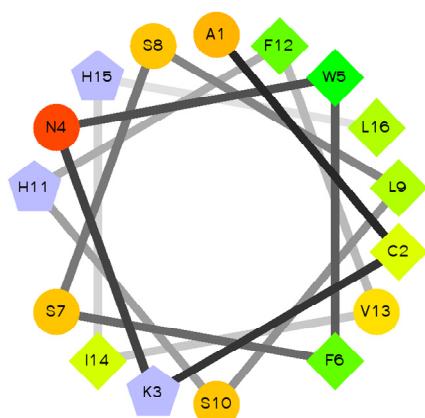
Proteinen in Huntington, Elongation factor 3, Protein phosphatase 2A und Target of Rapamycin 1“ (Andrade und Bork, 1995). HEAT-Motive formen eine stabförmige Struktur und sind involviert in intrazellulären Transport. NES und NLS-Sequenzen sind ebenfalls vorhanden, so dass eine Transportfunktion in und aus dem Nukleus möglich ist (Xia et al., 2003; Cornett et al., 2005). Wichtig für eine mögliche Involvierung des UPS sind Ubiquitinierung und Sumoylierung von Htt. Die N-terminalen Lysinreste K6, K9 und K15 können sowohl ubiquitiniert (Kalchman et al., 1996) als auch sumoyliert (Steffan et al., 2004) vorliegen.

Wie bereits erwähnt gibt es vermehrt Hinweise, dass lösliche Intermediate, Monomere oder Oligomere für die beobachtete Zytotoxizität während der Pathogenese der Zellen bzw. des ganzen Organismus verantwortlich sind. Die Aggregate hätten dagegen eine protektive Funktion (Saudou et al., 1998; Cummings et al., 1999; Arrasate et al., 2004; Schaffar et al. 2004; Behrends et al., 2006) bzw. störten zelluläre Prozesse lediglich durch ihre Ausdehnung und Inkorporation wichtiger Bestandteile. Diese Resultate sprechen dafür, dass eine wichtige Determinante für die Genese der Toxizität der Aggregationsstatus des betreffenden aggregierenden Proteins ist. Träfe diese Hypothese zu, dann sollten lösliche Monomere oder Intermediate nach Inkorporation in Aggregate oder durch anderweitige Eliminierung zu einer reduzierten Zytotoxizität führen. Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass flankierende Sequenzen an der PolyQ-Sequenz sowohl die Aggregation als auch die Toxizität beeinflussen können (Duennwald et al., 2006; Darnell et al., 2007). Ferner wurde gezeigt, dass hydrophobe Fragmente in Aggregaten von Patienten mit *C. Huntington* nachweisbar sind, und es wird angenommen, dass eine proteolytische Prozessierung einen wichtigen Schritt in der Pathogenese von PolyQ-Erkrankungen darstellt (Lunkes et al., 2002; Graham et al., 2006; Haacke et al., 2006; Haacke et al., 2007). Daher wird häufig das expandierte Htt Exon-1 als Modellprotein um die zellulären Effekte genauer zu untersuchen, herangezogen.

Insgesamt galt es also eine flankierende Sequenz an Htt zu fusionieren, welche die Aggregation und Zytotoxizität von Htt in seiner expandierten Form beeinflusst. Aus Hefearbeiten war bekannt, dass einige solcher in Frage kommenden flankierenden Sequenzen auch mit Chaperonen interagieren können, z.B. das Y-Peptid (Li et al., 2004), APPY (Montgomery et al., 1999) oder das CL1-Degron (Gilon et al., 1998). Als optimal wurde im Zusammenhang mit dieser Arbeit eine flankierende Sequenz angesehen, welche einerseits zu einer erhöhten Löslichkeit des expandierten Htts führt, die Zytotoxizität erhöht und gleichzeitig die Proteine für den proteasomalen Abbau markiert. Eine Beteiligung des UPS

insbesondere an PolyQ-assoziierten Erkrankungen wurde bereits unter Einleitung 2.4 und 2.5.4 beschrieben.

Alle diese für dieses Projekt wünschenswerten Eigenschaften hat die CL1-Sequenz in sich vereint. Das CL1-Degron, fusioniert an Htt96Q, zeigte in Hefe eine hohe Zytotoxizität, so dass diese flankierende Sequenz, C-terminal an Htt96Q-fusioniert, auch in der vorliegenden Arbeit im mammatischen System analysiert wurde. Der Name „Degron“ wurde 1994 geprägt (Dohmen et al. 1994) und bezeichnet eine spezifische N- oder C-terminale A-Sequenz eines Proteins, welche das betreffende Protein zum Abbau (Degradation) bestimmt und zum Ort der Degradation leitet. Das CL1-Degron wurde erstmals 1998 von Gilon et al. im Rahmen einer systematischen Analyse von Degradationsignalen für alternative UPS-Signalwege in *S. cerevisiae* untersucht. Dabei wurden zwei Reportergenbibliotheken konstruiert, basierend auf lacZ- oder URA3-Genen, welche Fusionsproteine mit einer großen Vielfalt C-terminaler Extensionen exprimierten. Daraus wurden Klone, u.a. der Klon 1 (CL1), isoliert, deren instabile Fusionsproteine in verschiedenen ubc-Mutanten stabilisiert werden konnten.



**Abb. 2.12: Modell einer putativen  $\alpha$ -Helix des CL1-Degrongs.** Das CL1-Degron wurde in Anlehnung an Gilon et al. 2000 als Helix-Rad-Projektion dargestellt, welche die Wechselbeziehungen der As untereinander verdeutlichen soll. Hydrophile As-Reste werden hier als Kreise dargestellt, hydrophobe Reste als Quadrate und positiv geladene Reste als Pentagon. Zusätzlich wurde die Hydrophobizität durch Farben repräsentiert: Die Hydrophobizität nimmt von grün nach gelb ab. Hydrophile Reste sind rot dargestellt, geladene Reste hellblau.

Das CL1-Degron besteht aus 16 As mit der folgenden Sequenz: ACKNWFFSSLSLHFVIHL, wobei die fettgedruckten vier Aminosäuren ein in allen von Gilon et al., 1998 im Rahmen der Analyse identifizierten Klonen wiederkehrendes Motiv darstellt. Die unterstrichene Sequenz stellt eine hydrophobe Region im Hydropathie-Diagramm nach Kyte und Doolittle, 1982, dar, ähnlich einer hydrophoben Region im Inneren von Proteinen oder in Membranen. Die As-Sequenz des CL1-Degrongs findet sich nicht in einer *S. cerevisiae*-Datenbank mit bekannten oder putativen ORFs, und es wurden auch keine Homologien gefunden. In einer nachfolgenden Studie (Gilon et al., 2000) wurde gezeigt, dass eine Substitution eines hydrophoben As-Restes innerhalb des Degrons durch A oder eine andere geringen Raum einnehmende As das Degradationssignal zerstört.

Ferner wurde beschrieben, dass das CL1-Degron eine nahezu perfekte amphipathische  $\alpha$ -Helix mit einer hydrophoben Seite, geformt aus den sechs raumgreifenden hydrophoben

As-Resten bildet (s. Abb. 2.12). In Übereinstimmung mit diesem Modell führte der beschriebene Austausch der hydrophoben As zu einer starken Reduzierung der Degradationssignalstärke. Histidin-Mutanten aus dieser Studie (Gilon et al., 2000) (H11A und H15A) sowie Mutationen einiger der C-terminalen hydrophoben As-Reste inhibierten die Degradation der fusionierten Proteine nicht, und es waren alle Degradationswege in der Lage, Fusionsproteine zum Proteasom zu lenken. Damit war eine andere wichtige Eigenschaft einer PolyQ-flankierenden Sequenz für dieses Projekt erfüllt: Zumindest im Hefesystem wurden Proteine zum Proteasom gelenkt.

Eine spätere Arbeit zeigte dann, dass der proteasomale Abbau von CL1-Fusionsproteinen wahrscheinlich am ER stattfindet, der Weg über ERAD verläuft und Ubiquitin involviert ist (Metzger et al., 2008).

Die bisher genannten Studien wurden im Hefesystem durchgeführt, hier sollte das CL1-Degron jedoch im mammalischen System verwendet werden. Auch im mammalischen System wurde das CL1-Degron bereits genutzt, und zwar als Degradationssignal für das Reporterprotein GFP (Bence et al., 2001). Dabei wurde nicht nur gezeigt, dass das CL1-Degron offenbar auch im mammalischen System Proteine für die Degradation bestimmt, sondern auch, dass aggregierende Proteine ( $\Delta F508$  Mutante des CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, und expandierte Htt-Fragmente) den Abbau des Fusionsproteins GFP-CL1 inhibieren. Damit sollte sich das CL1-Degron auch für die Fusion an Htt und dessen expandierte Formen und nachfolgende Analyse von Degradation und Toxizität eignen.

## 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Eine Reihe scheinbar nicht miteinander verwandter neurodegenerativer Erkrankungen, einschließlich *M. Alzheimer*, *M. Parkinson* und *C. Huntington*, weisen bemerkenswerte biochemische und pathophysiologische Gemeinsamkeiten auf. Bei jeder dieser Erkrankungen sind mutierte, amyloidogene Proteine in Fehlfaltungs- und Aggregationsprozesse involviert. Dabei wurde bis heute nicht eindeutig nachgewiesen, welche strukturellen Determinanten dieser in Sequenz und Länge verschiedenen Proteine zur Ausbildung ähnlicher amyloider, aggregierender und schließlich zytotoxischer Strukturen führen. Eng damit verbunden steht eine Hypothese, wonach lösliche Monomere oder Intermediate zur Aggregation neigenden Proteine die für die Zelle eigentlich toxischen Spezies darstellen. Ein Disput besteht zudem, ob oder zu welchem Anteil die Zytotoxizität durch Aggregation des fehlgefalteten Proteins

selbst resultiert, oder inwieweit auf einem Funktionsverlust, bedingt durch Fehlfaltung und Aggregation.

In der vorliegenden Arbeit sollte sowohl in Modellen mit *de novo* generierten  $\beta$ -Faltblattproteinen, als auch durch Aminosäureanaloga forcierte Proteinaggregation und am Beispiel des Huntingtins mit expandierter PolyQ-Sequenz, strukturelle Determinanten analysiert werden, welche eine Zytotoxizität in humanen Zellen induzieren.

Um den Effekt der Funktionsverstärkung fehlfaltender, amyloider Proteine zu untersuchen, sollten *de novo* generierte  $\beta$ -Faltblattproteine eingesetzt werden, welche keine ihnen inhärenten, evolutionsbedingten physiologischen Funktionen besitzen. Dabei sollte den Fragen nachgegangen werden, ob diese Proteine im Vergleich zu *de novo* generierten  $\alpha$ -helikalen Proteinen zytotoxisch sind, und wenn ja, ob die Zytotoxizität durch gezielte Veränderung modifiziert werden könnte, ob sie *in vivo* aggregieren und amyloide Eigenschaften aufweisen, ob präfibrilläre Intermediate vorliegen und mit einer möglichen Zytotoxizität korrelieren, ob sie die Proteinhomöostase beinträchtigen bzw. selbst als artifiziell generierte Proteine der Qualitätskontrolle unterliegen, mit welchen zellulären Proteinen Interaktionen eingegangen werden und ob das System molekularer Chaperone negativ beeinflusst wird bzw. molekulare Chaperone eine mögliche Zytotoxizität kompensieren können.

Mit Hilfe eines Aminosäure-Analogons sollte eine mögliche Verstärkung der Zytotoxizität aggregierender Proteine während Inhibition proteasomaler Degradation untersucht und damit einhergehend amyloide und etwaige präfibrilläre Intermediate nachgewiesen werden.

Am Beispiel des Huntingtins in seiner expandierten Form sollte mit Hilfe eines hydrophoben fusionierten Degrons gezeigt werden, ob eine stärkere Inhibition des UPS auch im mammatischen System nachgewiesen werden könnte, ob eine Veränderung der Zytotoxizität messbar ist, ob dies mit einer Veränderung der Löslichkeit einhergeht und ob durch Modulation anderer zellulärer Parameter wie molekularer Chaperone oder durch Coexpression von nicht modifiziertem expandiertem Huntingtin eine Verminderung etwaiger Zytotoxizität erreicht werden könnte.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind unter 8.1 Anhang A aufgeführt.

#### 3.1.2 Sonstige Geräte/Verbrauchsmaterialien

Sonstige Materialien/Verbrauchsmaterialien sind unter 8.2 Anhang B aufgeführt.

#### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien wurden hauptsächlich von den Firmen Sigma, Merck, Calbiochem, Invitrogen, Gibco, Serva, Fluka, Roth, BioMol, VWR oder Roche verwendet. Allgemeine Chemikalien und Reagenzien sind unter 8.3 Anhang C aufgeführt.

#### 3.1.4 Software

Aida 4.15	Raytest (Straubenhardt, Deutschland)
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems (San Jose, USA)
DNA-Star	DNA-Star Inc. (Madison, USA)
LeicaAnalysis	Leica (Wetzlar, Deutschland)
SDSC Biology Workbench	University of Illinois (Urbana-Champaign, USA)
SigmaPlot 10.0	Systat Software (San Jose, USA)

#### 3.1.5 Spezielle Reagenzien und Testsysteme für molekularbiologische Methoden

##### 3.1.5.1 Bakterien

DH5α	Invitrogen (Carlsbad, USA)
TOP10	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Sure	Stratagene (La Jolla, USA)

##### 3.1.5.2 Enzyme

Herculase	Stratagene (La Jolla, USA)
Hot-Start-Turbo- <i>Pfu</i> -Polymerase, 2,5 U/µl	Stratagene (La Jolla, USA)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Ipswich, USA) oder Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

Ribonuclease A	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
T4 DNS Ligase 400 U/ $\mu$ l	Gibco (Carlsbad, USA)

### ***3.1.5.3 DNS-Längenstandards***

100 bp DNS-Leiter	Gibco (Carlsbad, USA)
1 kb DNS-Leiter	Gibco (Carlsbad, USA)

### ***3.1.5.4 Vektoren***

pBip-Luciferase	Prof. Dr. H. Wagner
pcDNA3	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pcDNA3.1(+) Hygro	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pcDNA3.1/myc-His A	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pEGFP-N1	Clontech (Mountain View, USA)
pIRES2-EGFP	Clontech (Mountain View, USA)
pHtt20Q	Dr. R. Martin Vabulas
pHtt96Q	Dr. R. Martin Vabulas
pHA-UbE $\Delta$	Dr. R. Martin Vabulas (Ub-EGFP)
pMyc-4-6	Prof. Dr. Michael H. Hecht
pMyc-17-6	Prof. Dr. Michael H. Hecht
pMyc-23-6	Prof. Dr. Michael H. Hecht
pHsp70-Luciferase	Prof. Dr. H. Wagner
pHtt20-CL1	Dr. Sarah Broadley
pHtt96Q-CL1	Dr. Sarah Broadley
pProEX Htb Hsp110	Dr. Zdravko Dragovic
pBAD-GFP-L16-MBP	Dr. Hung-Chun Chang
n86 (2399)	Prof. Dr. Michael H. Hecht
S824 (2400)	Prof. Dr. Michael H. Hecht
S836 (2401)	Prof. Dr. Michael H. Hecht

### **3.1.5.5 Oligonukleotide und in Vektoren inserierte Konstrukte**

Alle Oligonukleotide, die als Primer bei PCR-Reaktionen verwendet wurden, sind von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen worden. Die Namen der Oligonukleotide, ihre Basensequenz, sowie der Name des klonierten Konstruktet sind unter 8.4 Anhang D aufgelistet.

### **3.1.5.6 esiRNAs**

Hsp110-esiRNA	Prof. Dr. Frank Buchholz (Dresden, Deutschland)
EGFP-esiRNA	Prof. Dr. Frank Buchholz (Dresden, Deutschland)

### **3.1.5.7 Testsysteme**

dNTP Set	Metabion (Martinsried, Deutschland)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
GeneMorph II random mutagenesis kit	Stratagene (La Jolla, USA)
Minipreps SV Wizard	Promega (Madison, USA)
PCR Clean-Up-System	Promega (Madison, USA)

### **3.1.5.8 Medien und Stocklösungen**

#### *LB-Medium*

1 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefe Extrakt (w/v), 1 % NaCl (w/v), in H<sub>2</sub>O und autoklavieren

#### *Ca<sup>2+</sup>/Glycerinpuffer für die Präparation kompetenter Bakterien*

100 ml einer 0,6 M CaCl<sub>2</sub>-Stocklösung (final 60 mM); 20 ml einer 0,5 M PIPES-Stocklösung pH 7,0 (10 mM final); 150 ml Glycerin (15 % v/v); 730 ml ddH<sub>2</sub>O auf 1,0 Liter; steril filtriert.  
Stocklösungen:      0,6 M CaCl<sub>2</sub>-Stocklösung: 8,832 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O in 100 ml ddH<sub>2</sub>O  
                        0,5 M PIPES-Stocklösung: 15,12 g PIPES in 100 ml ddH<sub>2</sub>O

#### *50 x TAE-Agarosegelektrophorese-Puffer*

24,2 % (w/v) TRIS, 5,71 % (v/v) Eisessig, 3,72 % (w/v) EDTA in H<sub>2</sub>O

#### *1 x TAE-Agarosegelektrophorese-Puffer*

0,484 % (w/v) TRIS, 0,112 % Essigsäure (v/v), 0,074 % (w/v) EDTA in H<sub>2</sub>O

---

*Ladepuffer 10 x für die Agarosegelektrophorese*

50 % Saccharose (w/v), 0,09 % Bromphenolblau (w/v), 0,09 % Xylencyanol (w/v), 0,10 % Orange G (w/v), 60 mM EDTA pH 8,0, in H<sub>2</sub>O

**3.1.6 Spezielle Reagenzien und Testsysteme für proteinbiochemische Methoden**

**3.1.6.1 Enzyme**

Benzonase	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
Pepsin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Proteinase K	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin Gold MS Grade	Promega (Madison, USA)

**3.1.6.2 Testsysteme**

BCA Protein Assay	Pierce (Rockford, USA)
Bis-Tris NuPage Novex Gele	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Complete Mini EDTA free	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, USA)
ECL Plus Western Blot Detection Kit	Amersham Bioscience (Freiburg, Deutschland)
Luciferase Assay System Reagents	Promega (Madison, USA)
μMACS Epitope Tag Protein Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Auburn, USA)
Mol.Wt Markers HMW	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Protein A, gebunden an Sepharose	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Protein G, gebunden an Sepharose	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Proteinmarker PageRuler prestained	Fermentas (Burlington, Kanada)
ZipTip <sub>C18</sub>	Millipore (Zug, Schweiz)

**3.1.6.3 Antikörper**

Die verwendeten Antikörper sind unter 8.5 Anhang E aufgelistet.

**3.1.6.4 Puffer und Stocklösungen**

*Transferpuffer für Western Blotting*

0,30 % TRIS (w/v), 1,44 % Glycin (w/v), 20,0 % MetOH (v/v), in H<sub>2</sub>O

*Trenngelpuffer für die SDS-PAGE*

1,5 M TRIS-HCl, pH-Einstellung auf 8,8 mit 37 %iger Salzsäure, in H<sub>2</sub>O

*Sammelgelpuffer für die SDS-PAGE*

0,5 M TRIS-HCl, pH-Einstellung auf 6,8 mit 37 %iger Salzsäure, in H<sub>2</sub>O

*Laufpuffer 1 x für die SDS-PAGE*

25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 1 % SDS (w/v), in H<sub>2</sub>O

*Probenpuffer 2 x für SDS-PAGE (modifiziert nach Laemmli, 1970)*

63 mM TRIS-HCL mit pH 6,8, 1 % SDS (w/v), 25 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol (v/v), 0,01 % Bromphenolblau (w/v), in H<sub>2</sub>O

*SDS-Gel-Färbelösung*

0,05 % Coomassie Brilliant Blue (w/v), 10 % Essigsäure (v/v), 50 % Methanol (v/v), in H<sub>2</sub>O

*SDS-Gel-Entfärbelösung*

30 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), in H<sub>2</sub>O

*Stripping-Puffer für Western Blots und Slot Blots*

63 mM TRIS-HCl (pH 6,7), 2 % SDS (w/v), 100 mM β-Mercaptoethanol

*Ponceau S-Lösung*

0,2 % Ponceau S (w/v); 0,3 % TCA (v/v); in H<sub>2</sub>O

*EDTA-Stocklösung 0,5 M, pH 8,0*

Es wurden 186,1 g Na<sub>2</sub>EDTA · 2 H<sub>2</sub>O in 700 ml H<sub>2</sub>O gelöst, der pH-Wert mit gesättigter NaOH-Lösung auf 8,0 eingestellt und mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.

*TBS 10 x*

2,42 % TRIS (w/v), 8,0 % NaCl (w/v), pH-Wert auf 7,6 mit 37 %iger Salzsäure, in H<sub>2</sub>O

*PBS 10 x*

8 % NaCl (w/v), 0,2 % KCl (w/v), 1,15 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (w/v), 0,2 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (w/v), pH 7,3, in H<sub>2</sub>O

*1 x PBS*

155, 17 mM NaCl, 2,71 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,54 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, in H<sub>2</sub>O

*Lysepuffer für die Lyse unter nativen Bedingungen (für IPs, Slot Blots, Dot Blots, Gelfiltrationen, Dichtegradientenzentrifugationen)*

In 8,0 ml PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat (entspricht 0,05 g); 0,5 % (v/v) Triton-X-100 (entspricht 50 µl); alternativ auch 1 % (v/v) Triton oder 1 % w/v CHAPS; 400 µl einer Protease-Inhibitor Complete-Lösung (ohne EDTA) aus einer 25 x Stocklösung; 0,3 mg/ml Prestatin A (entspricht 10 µl einer Stocklösung mit 3 mg/ml); 0,3 mg/ml Leupeptin (entspricht 10 µl einer Stocklösung der Konzentration 3 mg/ml); 0,3 mg/ml Aprotinin (10 µl aus einer 3 mg/ml Stocklösung); 1 mM PMSF (20 µl einer Stocklösung der Molarität 0,5 M); AEBSF (Pefablock®): 1 mM final, das entspricht 10 µl einer 1 M Stocklösung; 10 mM Mg<sup>2+</sup> final, entspricht 100 µl einer 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung (Mg<sup>2+</sup> essentiell für Benzonase). Das Volumen der Lösung wurde um 1390 µl auf 10,00 ml ergänzt, nochmals gut gemischt, und wurde dann auf Eis gelagert.

*ECL-Lösung I*

100 mM Tris-HCl pH 8,8; 2,5 mM Luminol-(3-aminophthalhydrazid); 0,4 mM p-Kumarinsäure

*ECL-Lösung II* 100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Reduzierender Puffer* 4 %ige SDS-Lösung (w/v) und 100 mM DTT in PBS.

*ABC-Puffer für Trypsinierung im Gel* 50 mM ABC in Wasser, pH 8,0

*Entfärbungspuffer* 25 mM ABC und 50 % (v/v) EtOH

*Reduktionspuffer für die Massenspektroskopie* 10 mM DTT in 50 mM ABC-Puffer

*Alkylierungspuffer* 55 mM Iodacetamid in 50 mM ABC-Puffer

*Extraktionslösung für Peptide aus LDS-Gelen* 3 % (v/v) TFA und 30 % Acetonitril in H<sub>2</sub>O

### 3.1.6.5 Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid Gelen

**Tab. 3.1: Übersicht über die eingesetzten Volumina für SDS-PA-Gele.**

Gel in %	2 M Saccharose (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	30 % Acylamid/Bisacrylamid (ml)	Gel Puffer (ml)	10 % (w/v) SDS (ml)
4	0	6,1	1,3	2,5	0,1
7	3,16	1,94	2,3	2,5	0,1
8	2,95	2,05	2,7	2,5	0,1
10	2,5	1,56	3,3	2,5	0,1
12	2,1	1,30	4,0	2,5	0,1
15	1,46	0,913	5,0	2,5	0,1

Um die Polymerisation zu beschleunigen, wurden zu jedem Ansatz 50 µl 10 % (w/v) APS (Polymerisationsinitiator) und 5 µl (Trenngel) bzw. 10 µl (Sammelgel) TEMED (katalysiert die Bildung freier Radikale) hinzupipettiert.

### 3.1.7 Spezielle Reagenzien und Testsysteme für zellbiologische Methoden

#### 3.1.7.1 Zelllinien

HEK293T ATCC (Manassas, USA)

(Mensch, ATCC Nummer:

CRL-11268)

Hela (Mensch, ATCC Nummer: CCL-2) ATCC (Manassas, USA)

N2a (Maus, ATCC Nummer: CCL-131) ATCC (Manassas, USA)

#### 3.1.7.2 Reagenzien

DMEM	Biochrom
FCS	Gibco (Carlsbad, USA)
Opti-MEM® I Serumreduziertes Medium	Invitrogen (Carlsbad, USA)
PBS	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trypsin EDTA (1X) Solution	Gibco (Carlsbad, USA)
L-Glutamin, 200 mM (100x)	Gibco (Carlsbad, USA)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Carlsbad, USA)
MEM mit nicht-essentiellen As	Gibco (Carlsbad, USA)
Nilrot	Invitrogen (Carlsbad, USA; AG Dr. Walther)
Trypanblau, 0,4 % steril	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
LipofectAMIN Plus	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen (Carlsbad, USA)

### 3.1.7.3 Testsysteme

ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Image-IT Live Green Reactive Oxygen Species Detection Kit	Molecular Probes (Carlsbad, USA)
Luciferase Assay System Reagents	Promega (Madison, USA)
LumioTM In-Cell Labeling Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
MitoTracker Red CM-H <sub>2</sub> XRos	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Phalloidin-Rhodamin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Prolong Antifade Kit	Molecular Probes (Carlsbad, USA)

### 3.1.7.4 Medien und Stocklösungen

#### MTT-Stocklösung

5 mg/ml MTT in 0-DMEM, gelöst unter Erwärmen und Mischen, anschließend steril filtriert.

Lysepuffer für den MTT-Test: 20 % SDS (v/v), 50 % DMF (v/v), pH 4,7

Geneticin (G418)-Stocklösung: β(Geneticin) = 100 mg/ml

Die betreffende Masse Geneticin pro geliefertes Probengefäß betrug 5 g, wobei das gelieferte Produkt eine Aktivität von nur 70 % bis 80 % besitzt. Um eine Lösung von 0,1 g/ml herzustellen, wurden 5 g in 34 ml 0-DMEM gelöst und mit einer 25-ml Pipette resuspendiert bis alles gelöst war. Mit konzentrierter NaOH wurde der pH-Wert auf ca. 7 eingestellt und die Lösung auf 35 ml aufgefüllt.

Geneticin-Lösung finaler Konzentration zur Kultivierung stabiler HEK293T-Zelllinien

1,2 mg/ml, z.B. für 1 ml Medium 10-DMEM 12 µl der Geneticin-Stocklösung

Hygromycin B-Lösung zur Generierung und Kultivierung stabiler HEK293T-Zelllinien

0,5 mg/ml; für 1 ml Medium 10-DMEM 2,3 µl der Hygromycin B-Stocklösung (1,0 mg/ml)

Paraformaldehyd-Lösung 4 %ig (w/v)

Es wurden 7 g pro 100 ml H<sub>2</sub>O Paraformaldehyd eingewogen und 1 h zwischen 50 °C und 60 °C unter Rühren in Suspension gebracht. 100 µl bis 250 µl konzentrierter NaOH-Lösung wurde unter Rühren addiert, bis die Suspension klar und das Paraformaldehyd in Lösung gegangen war. Die erhaltene Lösung wurde mit 60 ml 3 x PBS-Puffer versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf 175 ml aufgefüllt, steril filtriert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

*Kryomedium für die Kryokonservierung*

90 % FCS (steril) und 10 % DMSO (steril)

*Zellkulturmedium zur Kultivierung von HEK293T-, N2a- und HeLa-Zellen*

450 ml DMEM ohne Glutamin und ohne Pyruvat

50 ml FCS

5 ml P/S 10.000 units/ml (100x)

5 ml L-Glutamin 200 mM (100x)

5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100x)

*Akridinorange-Stockpuffer I*

20 mM Citrat-Phosphat, pH 3,0; 0,1 mM EDTA; 0,2 M Saccharose; 0,1 % Triton X-100 (v/v); steril filtriert.

*Akridinorange-Stockpuffer II*

10 mM Citrat-Phosphat, pH 3,8; 0,1 M NaCl; steril filtriert.

*ANS-Stocklösung*

M = 299,3 g/mol; 0,2933 g in 10,0 ml 1 x PBS entspricht 100 mM (Stocklösung). Diese Lösung wurde 1 : 50 mit 1 x PBS und 1:2 mit je 50 % DMSO und 1,2-Propandiol verdünnt.

*MTT-Stocklösung der Konzentration 5 mg/ml*

Um 50 ml einer Stocklösung der Massenkonzentration 5 mg/ml herzustellen, wurden 250 mg des gelben MTT-Pulvers eingewogen und in 45 ml einer 0-DMEM-Lösung ohne FCS bei 37 °C erwärmt und geschüttelt. Nachdem sich das MTT-Salz nach etwa einer Stunde gelöst hatte, wurde das fehlende Volumen 0-DMEM ergänzt und die Lösung in 50 ml Plastikröhren steril filtriert. Die erhaltene MTT-Stocklösung wurde in ebenfalls sterile Gefäße aliquotiert und mit Aluminiumfolie gegen Licht geschützt bei -20 °C gelagert.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Klonierung

Mit Ausnahme der beiden Konstrukte pHA-Htt20Q und pHA-Htt96Q (s. 8.4 Anhang D) war es nicht möglich, vorhandene Restriktionsschnittstellen aus Vorlagenplasmiden (s. 3.1.5.4) zu nutzen und eine direkte Umklonierung vorzunehmen. Daher wurde die Umklonierung und/oder Mutagenese von bereits in andere Vektoren integrierte Konstrukte mit Hilfe der PCR und für diesen Zweck entsprechend konzipierten Primern vorgenommen (s. Übersicht über die klonierten Konstrukte und verwendeten Primer in 8.4. Anhang D). Als Akzeptorvektoren wurden stets pcDNA3.1-Hygromycin(+) (Invitrogen, Carlsbad, USA), pcDNA3.1/myc-His A (Invitrogen, Carlsbad, USA), pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, USA) oder pEGFP-N (Clontech, Mountain View, USA) eingesetzt; Donorvektoren und deren inserierte Sequenzen sind unter 3.1.5.4 und 8.4 Anhang D aufgelistet. Eine Sequenzierung bei der Firma Sequiserve wurde nach einem positiven Befund der Restriktionsspaltung vorgenommen. Im Falle der Klonierung der *de novo* Proteine wurden immer Primer mit den Schnittstellen *BamHI* und *XbaI*, sowie der zusätzlich eingefügten Schnittstelle *EcoRI* konstruiert. Eine Auflistung der zugehörigen Primer zu den Konstrukten befindet sich ebenfalls unter 8.4 Anhang D. pHtt20Q-CL1 und pHtt96Q-CL1 wurden von p423GAL1-HA-Htt (20Q oder 96Q) mit *BamHI* und *XhoI* herausgeschnitten und in einen gleichermaßen geschnittenen pcDNA3.1-Hygromycin(+-) Vektor mit 5,6 kb ligiert. pHA-Htt20Q und pHA-Htt96Q wurden generiert, indem der HA-Tag von pHtt20Q-CL1 und pHtt96Q-CL1 mit Hilfe von Herculase amplifiziert wurde, jedoch ohne das CL1-Degron, mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* der Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Die PCR-Produkte wurden dann mit *BamHI* und *XhoI* geschnitten und in den Vektor pcDNA3.1-Hygromycin(+) ligiert.

#### 3.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNS-Sequenzen spezifisch zu amplifizieren, nachzuweisen oder für präparative Zwecke nutzbar zu machen, wurden PCRs (Mullis et al., 1986) durchgeführt. Als DNS-Polymerase wurde Herculase (s. 3.1.5.2) verwendet und die Reaktion im Thermocycler PCR T3 durchgeführt. In nachfolgender Tabelle sind Mengen- bzw. Volumenangaben für eine Standard-PCR dargestellt. In einigen Fällen, wenn es Probleme mit der Amplifikation gab,

wie z.B. keine oder unspezifische Banden, wurde 10 % DMSO zugesetzt, die Konzentration der Primer erhöht und/oder die der dNTPs (Desoxy-Ribonukleotidtriphosphate).

**Tab. 3.2: Reaktionsansatz für eine Standard-PCR zur Amplifikation von DNS-Sequenzen.**

Reagenz	Volumen (in µl)
DNS-Lösung (final 50 ng/µl – 100 ng/µl DNS)	1,0
dNTPs (final 10 mM jede dNTP-Spezies)	5,0
5'-Primer 0,5 µM	1,0
3'-Primer 0,5 µM	1,0
10 x Herculase-Puffer	5,0
Herculase (final 5 U)	1,0
<b>Gesamt</b>	<b>50,0</b>

Die Proben wurden auf Eis gehalten und erst in den Thermocycler eingesetzt, wenn die Temperatur über 85 °C betrug.

**Tab. 3.3: PCR-Temperaturprogramm.**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	55 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min/kb
Finale Elongation	72 °C	10 min

Für analytische Zwecke wurden 35 Zyklen durchgeführt (Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation), für präparative Zwecke 30 Zyklen, da die Fehlerhäufigkeit ebenso wie die Zunahme der DNS-Konzentration der Amplifikate um  $c_n = c_0 (1 + x)^n$  zunimmt, wobei  $c_n$  die Konzentration der amplifizierten DNS,  $c_0$  die Konzentration der Ausgangs-DNS,  $x$  die Amplifikationseffizienz ( $x \leq 1$ ) und  $n$  die Zahl der Zyklen angibt.

### 3.2.1.3 Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Zur Mutation spezifischer Nukleotide innerhalb einer bestimmten DNS-Sequenz wurde die gesamte Plasmid-DNS inklusive der zu mutierenden Sequenz mit Hilfe zu einander komplementären, die Mutation tragenden Primern amplifiziert (Hutchinson et al., 1978). Der Reaktionsansatz war dabei identisch zu dem in Tab. 3.2, jedoch wurde ein verändertes PCR-Programm verwendet, wobei die Iteration der Zyklen 18 betrug (s. Tab. 3.4).

Die PCR-Produkte wurden mit 1 µl *DpnI* (entspricht 10 U) für 1 h bei 37 °C inkubiert, um methylierte parentale DNS zu eliminieren, anschließend wurden 1/5 des Ansatzes zur Transformation eingesetzt (s. 3.2.1.8), ausplattiert und schließlich Kolonien selektiert und weitervermehrt (s. 3.2.1.8, 3.2.1.9).

**Tab. 3.4: PCR-Temperaturprogramm zur ortsgerichteten Mutagenese.**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	55 °C	45 sec
Elongation	72 °C	13 min
Finale Elongation	72 °C	13 min

### 3.2.1.4 DNS-Restriktionsspaltungen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen des Typs II wurden jeweils zu 1/10 des Lösungsvolumens, in welchem die Restriktionsspaltung der DNS stattfinden sollte, hinzugegeben, jedoch nicht mehr als 100 U/µg DNS. Analytische Restriktionsspaltungen (ca. 200 ng DNS) wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt, präparative Restriktionsspaltungen in einem Gesamtvolumen von 50 µl (ca. 3 µg DNS). Neben der gelösten DNS, der Restriktionsendonuklease und dem optimalen Probenpuffer für das jeweilige Enzym, wurde häufig auch BSA nach Herstellerangaben zugesetzt, um die Star-Aktivität der verwendeten Restriktionsenzyme gering zu halten (Arber und Linn, 1969).

### 3.2.1.5 DNS-Agarosegelelektrophorese

Zur Größenauf trennung von DNS-Fragmenten wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentrationen von 1 % bis 2 % Agarose (w/v) verwendet (Rickwood und Hames, 1990). Die Agarose wurde in 100 ml 1x TAE Puffer in der Mikrowelle gelöst, Ethidiumbromidlösung mit 10 µg/ml hinzugegeben und die flüssige Agarose in einen Gelschlitten zum Aushärten gegossen, ein Kamm diente dabei zur Ausbildung von Taschen. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit zehnfach konzentriertem DNS-Ladungspuffer versetzt und nach Laden der Probe eine Spannung von 80 V angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-Leiter und eine 1 kb-Leiter verwendet (s. 3.1.5.3). Mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigte DNS wurde mit dem PCR Clean-Up-System durch Anionenaustausch-Chromatographie (Promega, 3.1.5.7) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in 30 – 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2.1.6 Ligation von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente wurden entweder durch komplementäre, kohäsive Enden oder durch nicht-kohäsive Enden in Vektoren ligiert. Vektor und Fragment wurden dazu in molaren

Verhältnissen von 1:2 bis 1:10 eingesetzt. Typische Reaktionsansätze enthielten 400 U T4-DNS-Ligase (NEB), 1x Ligationspuffer und insgesamt bis 1 µg DNS. Ligationen wurden entweder bei Raumtemperatur für 1 h oder über Nacht bei 16 °C inkubiert (Harvey et al., 1971).

#### **3.2.1.7 Präparation chemisch kompetenter Bakterien für die Transformation von DNS**

Die Präparation und Transformation chemisch kompetenter Bakterien (s. 3.2.1.8) erfolgte in Anlehnung an Dagert et al., 1979. Zwei Tage vor der eigentlichen Präparation wurde eine LB-Agarplatte ohne Antibiotika mit Bakterien vom Typ DH5 $\alpha$  mit Hilfe einer Impföse im 3-Ösenausstrich benetzt und bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Einen Tag vor der Präparation der kompetenten Zellen wurde eine Übernachtkultur von der LB-Platte in 2 ml LB-Medium angeimpft. Für die Präparation wurden 500 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit 0,5 ml der Übernachtkultur inokuliert und die Bakterien bei 37 °C und 240 rpm solange inkubiert, bis eine OD600 von 0,4 erreicht worden war. Die Zellen wurden dann mit 6000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert und in 40 ml eiskaltem Ca<sup>2+</sup>/Glycerinpuffer (s. 3.1.5.8) trituriert. Zentrifugation und Resuspension wurde einmal wiederholt und die in Ca<sup>2+</sup>/Glycerinpuffer resuspendierten Zellen für 30 min. auf Eis gelagert. Die Zellen wurden erneut bei 6000 g für 5 min. und 4 °C pelletiert und diesmal in 6 ml Ca<sup>2+</sup>/Glycerinpuffer aufgenommen und trituriert. Die Suspension wurde in 500 µl Aliquots in Eppendorf-Röhrchen verteilt, welche bereits auf zerstoßenem Trockeneis vorgekühlt worden waren, und wurden bei -80 °C gelagert.

#### **3.2.1.8 Transformation von DNS in chemisch kompetente Bakterien**

Zu transformierende Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 50 ng Plasmid-DNS unter leichtem Mischen versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 20 min. auf Eis inkubiert und ein Hitzeschock für 2 min. bei 42 °C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 min. auf Eis gestellt und nachfolgend mit 1,0 ml LB-Medium versetzt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C im Thermomixer bei 600 rpm inkubiert und dann auf LB-Agarplatten, Kanamycin oder Ampicillin enthaltend, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert (Sambrook und Russel, 2001).

#### **3.2.1.9 Plasmidpräparationen**

Zur Herstellung von kleineren Mengen (Minipräparation, ca. 20 µg gesamt) und größeren Mengen (Maxipräparationen, ca. 1 mg gesamt) Plasmiden, wurde ausgehend von einer

Kolonie oder einem vorgefertigten Glycerolstock, mit einer sterilen Pipettenspitze eine Anzahl Bakterien abgeschabt und in 5 ml oder 200 ml LB-Medium (s. 3.1.5.8) mit 100 mg/ml Ampicillin oder 50 mg/ml Kanamycin überführt. Die angeimpfte Kultur wurde bei 37 °C über Nacht mit 240 rpm inkubiert. Die Extraktion der Plasmide aus den Bakterien erfolgte nach Angaben des Herstellers der Mini- und Maxi-Präp Testsysteme (s. 3.1.5.7), wobei die Methode auf der Aufreinigung der Plasmide nach Birnboim und Dohley, 1979, beruht. Das erhaltene DNS-Pellet wurde im Falle der Maxi-Präparationen in 300 µl ddH<sub>2</sub>O (endotoxinfrei) aufgenommen, die Massenkonzentration photometrisch bestimmt (s. 3.2.1.10) und mit endotoxinfreiem ddH<sub>2</sub>O auf  $\beta = 1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt.

#### **3.2.1.10 Photometrische Quantifizierung von DNS**

Es wurde eine Dreifachbestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in der Probe bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und  $\lambda = 280 \text{ nm}$  mit Hilfe der Spektrophotometer UV-VIS DU640 oder GeneQuantPro (s. 8.1 Anhang A) vermessen. Eine Extinktionseinheit von 1,0, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm, entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger Plasmid-DNS, so dass auf diese Weise die Massenkonzentration der wässrigen Plasmidprobe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von 100 berechnet werden konnte:  $\beta(\text{Plasmid}) = \text{Extinktion} \cdot 100 \cdot 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Um mögliche Proteinkontaminationen zu detektieren, wurde das Verhältnis E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> gebildet. Lag das Verhältnis deutlich unter 1,8 wurde die DNS-Lösung erneut einem Reinigungsschritt unterzogen (Sambrook und Russel, 2001).

### **3.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.2.1 Lyse mammalischer Zellen für SDS-PAGE und Western Blot**

Die Zellen wurden vor der Lyse im Falle semiadhärenter Zellen in 10-DMEM von der Unterlage mit starkem Druck durch Pipettieren gelöst, bei adhärenten Zellen mit 0,5 ml Trypsin/EDTA gelöst. Die Zellen samt Überstand wurden dann für 2,5 min bei 500 g und RT abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 80 µl PBS aufgenommen und stark gemischt, um die Zellen homogen zu verteilen. Es wurden nun 80 µl auf 95 °C erhitzter Probenpuffer für die SDS-PAGE zu der Zellsuspension gegeben, der 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol enthielt. Das Zellhomogenat wurde sechs Mal durch eine 0,6 mm Kanüle in eine 1 ml-Spritze auf- und abgezogen, um etwaige Zelltrümmer und DNS durch Scherkräfte zu zerstören, anschließend wurde das Zellhomogenat für 3 min bei 95 °C erhitzt, um die Lysis der Zellen zu vervollständigen.

### **3.2.2.2 Lysis mammatischer Zellen unter nativen Bedingungen**

Die zu lysierenden Zellen wurden von den Platten oder Zellschalen mit einer Pipette und dem enthaltenen Medium abgespült und in ein 50 ml Plastikgefäß überführt. Dann wurden die Zellen im Medium für 5 min. bei 386 g zentrifugiert und pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml PBS zum Waschen resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Anschließend wurden sie für 2 min. bei 500 g zentrifugiert. Die Überstand wurde erneut abgesaugt, die Zellen wurden auf Eis gestellt und sofort in 150 µl Lysepuffer (s. 3.1.6.4) resuspendiert und gevortext. Die Zellsuspension im Lysepuffer wurde dann für 20 min. bei 4 °C rotiert, es wurde 4 µl Benzonase (25 U/µl) hinzugegeben und das Zelllysat für weitere 30 min. bis 40 min. bei 4 °C rotiert. Um Zeldebris vom löslichen Anteil zu separieren, wurde der Rohextrakt für 5 min. bei 1500 g bis 2000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und weiteren biochemischen Analysen unterzogen. Die Wahl der Detergenzen im Lysepuffer richtete sich danach, welchen biochemischen Versuchen das Proteinlysat nachfolgend unterzogen werden sollte. Hier spielte die kritische mizelläre Konzentration eine wichtige Rolle (Kleber, 1997), so dass zwischen 0,5 % - 3,0 % Desoxycholat, SDS, CHAPS, Triton-X-100 und Nonidet P40 je nach Versuch variiert wurde (Liebler et al., 2002b).

### **3.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurden photometrisch unter Verwendung des Coomassie Plus Protein Assay Reagent, welches Coomassie Brilliant Blue G250 enthält, bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm bestimmt (in Anlehnung an Bradford, 1976). Als Proteinstandard diente  $\beta(\text{BSA}) = 2,0$  mg/ml. Für die Kalibrationsgerade wurde dieser Standard auf folgende Konzentrationen mit PBS verdünnt: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 und 0,15625 µg/ml. Die Proteinlysate wurden von 1:50 bis 1:6400 des Ausgangslysates verdünnt. Auf diese Weise wurde wenigstens eine Konzentration des Lysates gefunden, welche im linearen Bereich der Kalibrationsgeraden lag. Als zweiter Blindwert, die Proben betreffend, wurde auch eine Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung des Lysepuffers angelegt. Zu den je 100 µl Standard für die Kalibrationsgerade und 100 µl Proteinprobe wurden jetzt je 100 µl des Coomassie Blue gegeben, gut durchmischt, und mit Hilfe des Programms KC4 im Plate-Reader nach 15 min. Entwicklungszeit bei 595 nm vermessen. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors wurde die Proteinkonzentration des jeweiligen Lysates berechnet.

### 3.2.2.4 SDS-PAGE

Um Zellextrakte elektrophoretisch aufzutrennen, wurden diskontinuierliche, eindimensionale Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGEs) unter reduzierenden denaturierenden Bedingungen gefahren (modifiziert nach Laemmli, 1970). Die Gele bestanden aus einem 7 %igen bis 15 %igen Trengel und einem 4 %igen Sammelgel, die genaue Zusammensetzung der Gele ist unter 3.1.6.5 beschrieben. Vor der Elektrophorese wurden die Proben nochmals für 3 min. auf 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert, um das Kondenswasser am Boden des Teströhrchens zu sammeln, und durchmischt, um etwaige Aggregate im Falle der PolyQ-Proteine zu resuspendieren. Die SDS-PAGE wurde dann in 1 x SDS-PAGE-Laupuffer in Mini-ProteanII-Apparaturen von BioRad bei U = 180 V durchgeführt. Als Größenmarker dienten vorgefärbte oder ungefärbte Proteine definierter Molmasse (s. Material 3.1.6.2).

### 3.2.2.5 Western Blot

Um Banden elektrophoretisch getrennter Proteinlysate durch Immunreaktionen zu detektieren, wurden die Proteine aus dem Gel mit Hilfe des Semi-Dry-Blot-Verfahrens auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (Burnette, 1981). Auf die Membran und sich darunter befindlichem Whatman-Papier wurde das Gel luftblasenfrei aufgelegt, eine zusätzlich Schicht Whatman-Papier darüber ausgebracht und so in die Blotting-Apparatur eingesetzt, dass das Gel zu Kathode zeigte und die Membran zur Anode. Auf diese Weise wurden die Proteine, die durch die Bindung an Dodecylsulfat als Anionen vorliegen sollten, auf die Membran transferiert. Das Blotten wurde dann für 90 min. bis 120 min. unter Kühlung und Rühren bei einer Stromstärke von I = 400 mA durchgeführt. Zur Überprüfung der Transfereffizienz und als Probenauftragskontrolle wurden die Membranen nach dem Blotting mit Ponceau S-Lösung für ca. 2 min. inkubiert, um das Gesamtprotein in den einzelnen Spuren zu visualisieren. Unspezifische Bindungspartner auf der Membran wurden durch das Blockieren mit 5 % Magermilch in TBS abgedeckt, bevor der primäre Antikörper für eine Über-Nacht-Inkubation bei 4 °C hinzugegeben wurde. In den Tabellen unter 8.5 Anhang E sind die verwendeten Antikörper, sowie deren Spezifikationen und Herkunft aufgeführt. Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal in TBS gewaschen und für 1 h bis 3 h mit den sekundären Antikörpern, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), versetzt (s. 8.5 Anhang E). Nach dreimaligem Waschen in TBS-T wurden die Membranen mit ECL-Plus-Reagenz (s. 3.1.6.2) bedeckt. Dieses wurde hergestellt, indem gleiche Volumina von Lösung A und B vereinigt

wurden. Das Prinzip des ECL-Plus-Reagenz beruht darauf, dass HRP die Umsetzung des Substrates Lumigen PS-3 Acridan zu einem Acridiniumester katalysiert. Dieses Intermediat kann mit Peroxiden unter leicht alkalischen Bedingungen reagieren und dabei Chemilumineszenz hoher Intensität mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 430$  nm erzeugen. Das hierbei resultierende Licht wurde von einer CCD-Kamera des Fujifilms Image Reader LAS-3000 detektiert. Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit der Programmsoftware AIDA.

#### **3.2.2.6 Dot Blot**

Der Dot Blot-Test wurde dann durchgeführt, wenn entweder schnell Rückschlüsse auf die Konzentration eines bestimmten Proteins gezogen werden sollten, oder wenn Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen analysiert werden sollten (wie z.B. oligomere Strukturen). Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  von Gelfiltrationsfraktionen, Dichtegradientenfraktionen oder Proteinlysate, zuvor auf die gleiche Proteinkonzentration (s. 3.2.2.3) eingestellt, auf eine Membran aufgetüpfelt. Die Membran wurde an der Luft leicht getrocknet, aber nicht vollständig, und dann unter Blockierung in 5 % Milchpulver in TBS der gleichen Prozedur wie ein Western Blot (s. 3.2.2.5) unterzogen.

#### **3.2.2.7 Filter-Retardationstest**

Zur Detektion von Aggregaten, größer als 0,2  $\mu\text{m}$  im Durchmesser, wurde ein Filter-Retardationstest eingesetzt (Slot Blot filtertest, Scherzinger et al., 1997), wobei Zelllysate unter Vakuum durch eine Zelluloseacetatmembran mit der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert wurden. Um sowohl den löslichen als auch den nicht-löslichen Anteil eines bestimmten Proteins zu bestimmen, wurde auch alternativ eine Nitrozellulosemembran verwendet, wie sie auch für Western Blots eingesetzt wurde. Mammatische Zellen wurden wie unter 3.2.2.2 beschrieben lysiert und für den Filter-Retardationstest mit einem äquivalenten Volumen Reduktionspuffer (s. 3.1.6.4) versetzt, so dass die finale SDS-Konzentration 2 % (w/v) betrug und 50 mM DTT in der Lösung enthalten waren. Die Gesamtproteinkonzentration, die für die verschiedenen Versuche verwendet wurde, betrug zwischen 200  $\mu\text{g}$  und 1200  $\mu\text{g}$ . Die Membran wurde zunächst in Waschlösung für Slot Blot (PBS mit 0,1 % (w/v) SDS) äquilibriert, in die Apparatur eingespannt und die zu verwendenden Slots wurden mit je 400  $\mu\text{l}$  Waschlösung durchgespült. Nachdem die Proben für 5 min. auf 95 °C erhitzt worden waren, wurden sie in die entsprechenden Slots hinein pipettiert und der lösliche Anteil

hindurch gesaugt. Die Slots wurden dann noch dreimal mit Waschpuffer gewaschen, die Membran aus der Apparatur befreit und in 5 % Trockenmilch in TBS eingelegt. Das weitere Verfahren zur Detektion der Proteine auf der Membran entsprach dem unter 3.2.2.5 „Western Blot“ beschriebenen.

#### ***3.2.2.8 Ultrazentrifugation nativer Zelllysate zur Trennung von Aggregaten und löslichen Anteilen aggregationsfähiger Proteine***

Die Lysis der Zellen und die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie unter 3.2.2.2 beschrieben. Es wurden für die Analyse 25 bis 30 µg Protein eingesetzt, die in säurefeste Polyallomer Zentrifugationsrörchen (s. 8.2 Anhang B) auf Eis hineinpipettiert wurden. Die Proben wurde bei 4 °C für 30 min. bei 53.000 rpm (entspricht 100.000 g) im TLX Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für weitere Analysen auf Eis aufbewahrt, das Pellet wurde zweimal mit 50 µl Lysepuffer gewaschen. Die Überstände der Waschschrifte wurden verworfen und das Pellet anschließend in 2 x Probenpuffer nach Laemmli (s. 3.1.6.4) oder in konzentrierter Ameisensäure, wenn es sich um Aggregate mit PolyQ-Proteinen handelte (Hazeki et al., 2000), aufgenommen. Nach Verschluss der Röhrchen durch Parafilm wurden die Pellets unter Schütteln 30 min. bis 3 h je nach Aggregattyp im Heizblock bei 65 °C inkubiert. Im Falle der PolyQ-Aggregate wurde die Ameisensäure im Lyophilisator entfernt (ca. 30 min.) und nach Zugabe von 1 µl 5 M TRIS 2 x Probenpuffer hinzugegeben, so dass das enthaltene Bromphenolblau keine Gelbfärbung (sauer) mehr anzeigen sollte. Auch zum Überstand und zum äquivalenten Volumen des Ausgangslysates wurde 2 x Probenpuffer hinzugefügt und alle drei Proben Total (T), Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden für 3 min. bei 95 °C erhitzt und schließlich mittels SDS-PAGE (s. 3.2.2.4) und Western Blot (s. 3.2.2.5) weiter analysiert.

#### ***3.2.2.9 Immunpräzipitation (IP)***

Die Zellen wurden wie unter 3.2.2.2 „Zelllysis unter nativen Bedingungen“ beschrieben lysiert und Zelldebris durch Zentrifugation bei 2000 g abgetrennt. Der Überstand wurde für die IP weiterverwendet, wobei ca. 30 µl für die Analyse des Gesamtproteins (Western Blot) aliquotiert wurden. Alle Reaktionen wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. 20 µl 50 %ige Protein A- oder Protein G-Sepharose (je nach verwendetem Antikörper) pro zu präzipitierender Probe wurden zweimal in PBS gewaschen. Dazu wurde die Sepharose aufgeschlämmt, 1 min. bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert und in

100 µl Lysepuffer pro Probe aufgenommen. Um den Ak an die entsprechende Sepharose zu binden, wurden 10 µg des Aks in 200 µl PBS verdünnt und zu der aufgeschlämmten Sepharose hinzugegeben. Die Ak-/Sephrose-Suspension wurde für ca. 3 h bei 4 °C unter Rotieren inkubiert, um den Ak an Protein A oder G binden zu lassen. Anschließend wurde die Suspension dreimal mit Lysepuffer gewaschen und pro Probe 200 µl Lysepuffer zugesetzt (Liebler et al., 2002a). Die Suspension wurde jetzt zu dem Probelysat gegeben und über Nacht bei 4 °C rotiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 10 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Sepharose mit präzipitiertem Protein wurde dann zweimal mit 500 µl 0,1 % (v/v) Triton-X-100 in PBS gewaschen und zuletzt in 200 µl dieser Lösung aufgenommen. Anschließend wurden die Proben in eine Säule mit Filter (s. 8.2 Anhang B) gegeben und zentrifugiert, so dass die Sepharose zurückblieb und nicht-kovalent gebundenes Protein mit 50 µl 95 °C heißem 1 x Probenpuffer nach Lämmlie eluiert werden konnte. Dem Puffer wurde je nach Anwendung β-Mercaptoethanol zugesetzt, da der Ak unter reduzierenden Bedingungen in die schweren und leichten Ketten gespalten wird. Die Säule wurde für 1 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, die im Puffer gelösten Proteine konnten dann für weitere Analysen direkt in das SDS-PA-Gel geladen (s. 3.2.2.4) und mittels Western Blot untersucht werden (s. 3.2.2.5).

### **3.2.2.10 Dichtegradienten-Zentrifugation**

Zur Herstellung des Saccharose-Dichtegradienten wurde zunächst 6 ml 5 %ige (w/v) Saccharose-Lösung in ein Zentrifugationsrörchen SW41 Ti, 12 ml, blasenfrei eingefüllt und dann mittels einer Spritze mit 6 ml 20 %iger (w/v) Saccharose-Lösung unterschichtet. Die Rörchen wurden mit einem Deckel versehen und mit Hilfe des Gradientendrehtisches wurde der Gradient generiert, mit folgenden Parametern programmiert: Recall: 0; Zeit: 2,25 min.; Winkel: 81,5 °; Geschwindigkeit: 15 U/min. Nach dem Einsetzen der Rörchen in die zugehörigen Becher, wurden diese gegeneinander mit 5 %iger Saccharoselösung austariert und anschließend 100 µl bei allen Proben gleich konzentriertes Proteinlysat auf die Oberfläche der 5 %igen Saccharoselösung pipettiert, möglichst ohne Turbulenzen zu erzeugen. Die Becher mit den Rörchen wurden in den zugehörigen Rotor SW41 Ti eingehängt (s. 8.1 Anhang A und 8.2 Anhang B) und unter folgenden Parametern zentrifugiert: Beschleunigung: langsam; Temperatur: 4 °C; Zeit: 4 h; Umdrehungen: 40.000 pro min. (entspricht 200.000 g); Vakuum (modifiziert nach Li et al., 1998). Nach der Zentrifugation wurden Fraktionen mit Hilfe des Fraktionators Uniequip erzeugt. Folgende

Parameter wurden hier gewählt: Volumen 750 µl; Geschwindigkeit: 2,5; Pumpe: 3 ml/min.; Autozero nach 2 sec. Nachkalibrieren; Papiervorschub: 0,5 mm/sec. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Eis gehalten und *via* Filter-Retardationstest oder Western Blot weiter analysiert.

#### **3.2.2.11 Luciferase-Test *in vitro***

Um Aktivitäten des Reporterproteins der Leuchtkäfer- (Firefly-) Luciferase zu messen, wurden mammalische Zellen lysiert und die Aktivität der vorhandenen Luciferase *in vitro* mit Hilfe eines Luminometers bestimmt. Eine Million transfizierte Zellen (s. 3.2.3.4) wurden in Platten mit je zwölf Vertiefungen ausgesät, nach bestimmten Zeiten wurde das Medium über den Zellen abgenommen und durch 200 µl eines speziellen kommerziell erhältlichen Lysepuffers (s. 3.1.6.2) für Lumineszenz-Messungen ersetzt. Durch Agitation wurden semi-adhärente Zellen vom Boden der Platte gelöst und im Lysepuffer resuspendiert. Die Platte wurde dann für mindestens 30 min. bei -80 °C gefroren, so dass dabei und beim nachfolgenden Auftauprozess die Zellen auch mechanisch zerstört wurden. Nach dem Auftauen wurde das Zelllysat erneut resuspendiert und war zur Lumineszenz-Messung bereit. Das Gerät wurde mit Luciferin-Lösung (s. 3.1.6.2) befüllt und folgende Parameter für die Messung gewählt: Das injizierte Volumen Luciferin-Lösung betrug 50 µl; es wurde sofort mit der Messung begonnen; das Zeitintervall je Messung dauerte 10 s und es wurden 20 µl des Zelllysates pro Messung in die Röhrchen vorgelegt. Die ermittelten Werte wurden in relativen Lichteinheiten (RLUs) ausgegeben (modifiziert nach Schmidt et al., 2002).

#### **3.2.2.12 Größenausschlusschromatographie**

Um Proteine und deren Aggregate zu separieren, wurde die analytische Größenausschlusschromatographie herangezogen. Bei dieser Methode, auch als Gelfiltration oder Molekularsieb-Chromatographie bezeichnet, werden Moleküle nach ihrer Größe und Form getrennt. Die mit Molekularsieben, in diesem Falle ein Agarose-Derivat (Superose 6, Gel-Volumen = 2,4 ml), gefüllte Säule steht mit einem Lösungsmittel für die zu trennenden Moleküle im Gleichgewicht – hier PBS-Puffer. Um die Trennung zu beschleunigen wurde sie unter Druck mit Hilfe des Gelfiltrations-Systems SMART durchgeführt. Die Superose 6-Säule (PC 3.2/30) wurde stets vor jedem Versuch mit 1,0 M Natronlauge gereinigt, dann mit Wasser gewaschen und schließlich mit PBS-Puffer ohne Calcium und Magnesium als Laufmittel befüllt (Andersson und Hagel, 1984). Nach Transfektion (s. 3.2.3.4), Lyse unter nativen Bedingungen (s. 3.2.2.2) und Zentrifugation bei 2000 g für 5 min. und 4 °C wurden

die Lysate auf Eis gelagert und sequenziell 50 µl (entsprach 300 bis 450 µg Protein) mittels einer Hamilton-Spritze durch das Septum in den Ladeschlauch eingespeist. Als Elutionsmittel diente PBS bei pH = 7,5, um die Proteine unter möglichst physiologischen Bedingungen zu halten, es wurden 22 Fraktionen à 100 µl eluiert. Die initiale Flussrate betrug 10 µl/min, die mittlere 40 µl/min. Am Ende jeden Experimentes wurden zudem fünf Markerproteine aufgetrennt, um eine Kalibrationsgerade (MW vs. eluiertes Volumen oder Fraktionsnummer) zu erstellen. Bei diesen Markerproteinen handelt es sich um Blue Dextran 2000 (MW =  $2,0 \cdot 10^6$  g/mol), Thyroglobulin (MW =  $6,69 \cdot 10^5$  g/mol), Katalase (MW =  $2,32 \cdot 10^5$  g/mol), Rinderserumalbumin (MW  $6,3 \cdot 10^4$  g/mol) und Ribonuclease A (MW =  $1,37 \cdot 10^4$  g/mol). Der Logarithmus der Molmasse der Markerproteine (Abzisse) wurde gegen ihr Elutionsvolumen (Ordinate) aufgetragen, um eine Kalibrationsgerade zu erhalten und hieraus die Molmassen der erhaltenen Proteine in den aufgetrennten Proben ermittelt.

#### **3.2.2.13 Bestimmung der ATP-Konzentration nach Zelllysis**

Lyophilisiertes ATP wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt (entspricht 16,5 mM) und daraus durch serielle Verdünnung eine Standardkurve erstellt (1 mM bis 1 pM, der optimale Detektionsbereich liegt zwischen 10 µM und 100 pM). Je 50 µl der ATP-Standardlösung wurde mit je 50 µl Luciferase-Reagenz (s. 3.1.6.2, enthält Luciferin und Luciferase) versetzt und nach Mischen manuell mit 10 s Integrationszeit im Luminometer gemessen. Anschließend wurden von den Proben ebenfalls Verdünnungen erstellt und je 50 µl dieser Lösung zusammen mit 50 µl Luciferase-Reagenz gemischt, gemessen, zusätzlich zu einem Blindwert mit Puffer und Luciferase-Reagenz. Die ATP-Konzentrationen des Standards wurden doppelt-logarithmisch gegen die Relativen Lichteinheiten (RLU) aufgetragen und Probenverdünnungen aus dem optimalen Bereich der Standardkurve wurden für die Berechnung herangezogen. Die erhaltenen ATP-Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf die Zellzahl im Lysat bezogen und die ATP-Konzentration daraus errechnet, indem die Stoffenge an ATP pro Zelle durch das durchschnittliche Volumen einer HEK293T-Zelle geteilt wurde (Stanley, 1993; Thomas und Smart, 2005).

#### **3.2.2.14 Lyse und Co-IP der SILAC-markierten Zellen**

24 h nach Transfektion (s. 3.2.3.20) wurden die Zellen für 5 min. bei RT und 386 g pelletiert, das Pellet wurde bei RT vorsichtig in 1,5 ml PBS resuspendiert und erneut bei RT für 2,4 min.

bei 500 g pelletiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und die auf Eis gestellten Zellen wurden in 300 µl eiskaltem Lysepuffer (1 % Triton X-100 mit 1 x Complete Protease Inhibitor in PBS, s. 3.1.6.4) aufgenommen, resuspendiert und für 20 min. mit 17 Umdrehungen/min. bei 4 °C rotiert. Nach 20 min. wurde 8 µl Benzonase addiert und diese für weitere 40 min. bei 4 °C mit 17 Umdrehungen/min. rotiert. Von diesem Gesamtzelllysat wurden für die Analyse der SILAC-Aminosäuren Inkorporation in die Zellen (s. 3.2.2.16) 30 µl (1/10 der Probe) abgenommen, 30 µl des 2x Ladepuffers nach Laemmli mit 1/20 β-ME hinzugefügt und für 5 min. bei 95 °C erhitzt.

Um Zellmembranen und Debris vom Löslichen zu separieren, wurde das Gesamtzelllysat für 5 min. bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und hiervon eine Proteinkonzentrationbestimmung durchgeführt (s. 3.2.2.3). Die Lysate wurden in einem Verhältnis von 1:1:1 (leichte, mittlere, schwere Aminosäuren inkorporiert) gemischt. Das Volumen der gemischten Probe betrug jeweils ca. 725 µl, davon wurden 1/10 (entspricht 70 µl) als „Gesamtproteom“ abgenommen. Vor dem Einfrieren bei -80 °C wurden 25 µl 4x Ladungspuffer für Gradientengele hinzugefügt mit 1/20 β-ME und für 10 min. bei 70 °C erhitzt.

Zum verbleibenden Rest des Lysats (700 µl) wurden 50 µl Microbeads (s. 3.1.6.2), konjugiert mit α-Myc-Abs, hinzugegeben und bei 4 °C für eine Stunde bei 17 Umdrehungen/min. rotiert. Die Trennsäulen für die Microbeads wurden in den magnetischen Probenhalter eingespannt und mit 200 µl Lysispuffer äquilibriert, anschließend die 700 µl Probe auf die Säulen appliziert und der Durchfluss aufgefangen. 70 µl des Durchflusses (1/10 der vereinigten Proben) wurden aliquotiert, mit 25 µl 4 x Ladungspuffer inklusive 1/20 β-ME für Gradientengele versetzt und für 10 min. bei 70 °C vor dem Einfrieren bei -80 °C erhitzt.

Die Säulen wurden viermal mit 200 µl 0,1 % Triton-X-100 in PBS mit 1/10 Complete Inhibitor gewaschen und einmal mit 100 µl 1 x PBS, um Detergenz vor der Elution zu entfernen. Die Elution der Proben von den gebundenen Microbeads mit Antikörpern erfolgte mit 120 µl auf 70 °C vorgewärmten speziellen Ladepuffer für Gradientengele ohne β-ME. Letzteres wurde erst nach Elution mit 2,5 µl pro Probe addiert (Ong und Mann, 2006).

#### **3.2.2.15 Trennung, Alkylierung, Reduzierung, Trypsinierung und Anreicherung des SILAC-markierten Proteoms**

Es wurden 30 µl der Coimmunopräzipitation auf ein 4 % - 12 %iges Gradientengel geladen, bei 200 V getrennt und dabei darauf geachtet, dass sich zwischen den Proben mindestens zwei

leere Spuren befanden, um Kontaminationen der Proben im Gel auszuschließen. Das Gradientengel wurde für 10 min. in der Fixierungslösung für Novex-Bis-Tris-Gele bei RT geschwenkt, anschließend in Vorfärbelösung für 10 min. bei RT unter Agitation inkubiert. 5 ml kolloidaler blauer Färbelösung (s. 3.1.6.2) wurden für 5 min. hinzugegeben, Entfärbung und Reduktion des Hintergrundes erfolgten ü. N. mit 200 ml ddH<sub>2</sub>O.

Nach der Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel eingescannt und jede Spur in fünf Abschnitte eingeteilt. Jede Spur mit je einer Probe wurde in exakt diese Abschnitte mit dem Skalpell getrennt und in quadratische Gelstücke mit je einem Millimeter Seitenlänge zerschnitten, diese kleinen Gelwürfel in Eppendorf-Röhrchen transferiert und je zweimal bei 25 °C unter Rotieren bei 1400 rpm mit 500 µl Entfärbelösung behandelt. Diese Prozedur wurde ggf. wiederholt bis die Farbe vollständig aus den vorher angefärbten Proteinbanden verschwunden war. Die Gelstücke wurden dann für 10 min. mit 500 µl in 100 % absolutem EtOH dehydriert und die Prozedur wiederholt, bis sie hart und weiss waren. Das EtOH wurde entfernt und verbliebene Reste durch Verdampfen bei 30 °C unter Vakuum entzogen, die Gelfragmente wurden hiernach in 150 µl Reduktionspuffer (s. 3.1.6.4) rehydratiert und für 1 h bei 56 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugieren bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abgenommen und verworfen, auf die Gelstücke am Grund des Eppendorf-Röhrchens 150 µl Alkylierungspuffer (s. 3.1.6.4) hinzugegeben und für 45 min. bei 25 °C im Dunkeln mit 1400 rpm agitiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die Gelstücke je 2 x für 20 min. bei 25 °C mit Puffer für Trypsinierung gewaschen und dazwischen mit 100 % EtOH dehydriert und wieder im Trypsinierungspuffer rehydratiert. Vor der Inkubation mit Trypsin wurden die Gelstücke unter Schütteln und bei 25 °C zweimal mit Hilfe von 100 % EtOH dehydriert, die Gelstücke erneut für 5 min. bei 30 °C im Lyophilisator getrocknet und am Boden des Gefäßes konzentriert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und hierzu 80 µl eiskalter Trypsin-Lösung mit einer Massenkonzentration von β = 12,5 ng/µl für die enzymatische Spaltung der Proteine im Gel gegeben. Die Proben mit dem Enzym wurden für 30 min. bei 4 °C inkubiert, bis sie vollständig rehydratiert und mit Enzym gesättigt waren. Dann wurde die überschüssige Trypsin-Lösung abgenommen und die Proben mit Puffer für Trypsin-Spaltung ü.N. versetzt, welche bei 37 °C unter leichtem Schütteln stattfand.

Am nächsten Tag wurde der enzymatische Spaltungsprozess durch Zugabe von TFA mit einer finalen Konzentration von 0,1 % (v/v) unterbrochen. Die Proben wurden kurz gemischt, zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Probengefäß überführt. Die entstandenen Peptide wurden von der Gelmatrix durch zweimaliges Inkubieren mit Extraktionspuffer (s. 3.1.6.4) bei 25 °C unter Schütteln bei 1400 rpm eluiert. Nach jedem

---

Extraktionszyklus wurden die Gelfragmente abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit dem vorher gewonnenen vereinigt. Die Gelstücke wurden zum Schluss zweimal für 10 min. mit Acetonitril dehydriert, auch hier die Überstände mit den enthaltenen Peptiden nach Zentrifugation abgenommen und mit den vorherigen vereinigt.

Die Proben mit den gelösten Peptiden wurden im Lyophilisator konzentriert, indem das Lösungsmittel Acetonitril unter Vakuum und bei 30 °C abgezogen wurde, so dass nur ca. 10 % des Gesamtvolumens verblieb. Die Proben wurden dann entsalzt, gefiltert und die Peptide durch reverse LC in OMIX-C18-Säulen angereichert (s. 3.1.6.2). Dazu wurde die Säule für die jeweilige Probe dreimal mit 100 % Acetonitril äquilibriert, danach dreimal mit 0,1 %iger TFA. Die Proben wurden 40-mal durch die Säule gezogen, um die Peptide anzureichern, dann wurden 100 µl 0,1 %ige TFA in die Säule gegeben, so dass sie gefüllt und bedeckt war und die Proben konnten zur Injektion gegeben werden (modifiziert nach Ong und Mann, 2006).

### **3.2.2.16 Analyse der SILAC-Aminosäuren-Inkorporation in die Zellen**

Es wurden 18 µg der Gesamtzelllysate der unvereinigten Proben (mit leichter, mittlerer und schwerer Aminosäureinkorporation) auf einem Novex Bis-Tris Gradientengel (s. 3.1.6.2) aufgetrennt. Eine prominente Bande auf einer Höhe von ca. 70 kDa (wahrscheinlich Hsp70/Hsc70) wurde mit dem Skalpell ausgeschnitten und in 1 mm große Quadrate zerteilt. Dehydrierung, Alkylierung, Reduktion, Trypsinierung, Anreicherung und Elution erfolgten wie unter 3.2.2.15 beschrieben (Ong und Mann, 2006).

### **3.2.2.17 Massenspektrometrische Analyse der SILAC-markierten Co-IPs**

Die Peptidfragmente wurden aus den C18-Säulen mit 35 µl 80 % MetOH und 0,1 % TFA eluiert, konzentriert, und auf 6 µl mit Hilfe 0,1 % Ameisensäure aufgefüllt. 5 µl der Proben wurden auf eine C18-Kapillarsäule in 0,1 % Ameisensäure gespült (0,5 µl/min) und mit 0,3 µl/min nach folgendem Gradientenprofil eluiert (Dr. Sonya Schermann):

**Tab. 3.5: Gradientenprofil zur Elution der Peptidfragmente aus der C18-Kapillarsäule.**

Zeit t in min.	% des folgenden Puffers: 80 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure
0	2
5	8
80	33
90	50
95	80
110	80

Es folgte ein Waschschnitt für 60 min. zwischen den verschiedenen Proben. Die Peptidfragmente wurden dann direkt in das Gerät LTQ-FT Ultra mit Hilfe einer Nanoelektrospray-Quelle injiziert, wobei die Spannungen zwischen 1,5 bis 2,5 kV lagen. Um die Fragmentierungsdaten zu sammeln, wurde die „Top8“-Methode verwendet, und ein FT-Scan rangierend von 400 – 2000 (m/z) mit einer 100.000fachen Auflösung, gefolgt von Scans der induzierten Dissoziationen (collision induced dissociation, CID). Die CID Parameter wurden wie folgt eingestellt: Isolationsweite 3; normalisierte Kollisionsenergie 45 V; Aktivierungs Q 0,220; Aktivierungszeit 30 ms (Dr. Sonya Schermann).

### **3.2.2.18 Datenanalysen der SILAC-Experimente**

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Programms MaxQuant analysiert (Cox und Mann, 2008), wobei die folgenden Parameter eingestellt wurden (Dr. Sonya Schermann): Quant; SILAC Triplets, mittelschwere Markierung: Arg6, Lys4, schwere Markierung: Arg10, Lys8. Das Maximum der gelabelten Aminosäuren betrug 3. Variable Modifikationen: Oxidationen (M), Acetylreste (N-terminal). Fixe Modifikationen: Carbamidomethylgruppen (C). Datenbank: Humane IPI (ipi.Human.v3.56.fasta). Enzyme: Trypsin/P. MS/MS-Toleranz: 0,5 Da. Top MS/MS peaks/100 Da: 6. Peptid FDR: 0,01. Protein FDR: 0,01. Maximum PEP: 1. Minimum der einzige vorkommenden Peptide: 1. Minimale Länge der Peptide: 6. Minimum der Peptide: 1. Minimum Ratio count: 2.

Ein Protein wurde als  $\beta$ 23-Interaktor eingestuft, wenn für die unabhängigen Experimente I und III ein erhöhtes Verhältnis von  $\beta$ 23 zu  $\alpha$ S824 gefunden wurde. Bei Experiment II wurde ein Interaktor als spezifisch für  $\beta$ 23 angenommen, wenn ein erhöhtes Verhältnis für  $\beta$ 23/ $\beta$ 17 oder  $\beta$ 23/ $\beta$ 4 gefunden wurde. In gleicher Weise wurden die Interaktoren für  $\alpha$ S824 bestimmt.

Interaktoren, spezifisch für  $\beta$ 4 oder  $\beta$ 17, wurden bestimmt, indem die Daten von den oben angeführten Experimenten I und II kombiniert wurden. Jedes Replikat eines dieser Experimente basierte auf der gleichen  $\beta$ 23-Transfektion, deshalb konnten die Replikate für diesen Zweck der Datenanalyse gekoppelt werden. Für jedes einzelne Replikat wurden die Verhältnisse von  $\beta$ 23/ $\alpha$ S824 aus Experiment I durch das Verhältnis von  $\beta$ 23/ $\beta$ 17 oder  $\beta$ 23/ $\beta$ 4 aus Experiment II dividiert, um die Verhältnisse  $\beta$ 17/ $\alpha$ S824 oder  $\beta$ 4/ $\alpha$ S824 zu erhalten. Für jedes Replikat wurden Verhältnisse von  $\beta$ 17/ $\alpha$ S824 oder  $\beta$ 4/ $\alpha$ S824 größer als  $\beta$ 23/ $\alpha$ S824 angesehen und wurden damit als spezifische Interaktoren für  $\beta$ 4 oder  $\beta$ 17 eingestuft. Proteine, die erhöhte Verhältnisse von  $\beta$ 17/ $\beta$ 4 oder  $\beta$ 17/ $\beta$ 23 aufwiesen wurden ebenso als angereichert

mit dem *de novo* Protein  $\beta$ 17 angesehen, analog für  $\beta$ 4. Proteine wurden also dann als spezifische Interaktoren für  $\beta$ 17 oder  $\beta$ 4 eingestuft, wenn sie gegenüber den anderen beiden Proteinen in erhöhtem Verhältnis vorlagen oder gegenüber dem  $\alpha$ -helikalen Protein  $\alpha$ S824 in mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Um eine vergleichbare Liste für  $\beta$ 23 zu erhalten, wurde ein ähnlicher Selektionsprozess durchgeführt, mit dem zusätzlichen Kriterium, dass Proteine mit erhöhten  $\beta$ 23/ $\alpha$ S824-Verhältnissen auch in den korrespondierenden Replikaten in Experiment II gemessen werden mussten. Dies stellte sicher, dass die kleinere Anzahl Interaktoren spezifisch für  $\beta$ 23 nur solche Proteine umfasste, für die auch Daten betreffend der Interaktion mit  $\beta$ 17 und  $\beta$ 4 verfügbar waren (Dr. Sonya Schermann).

Die Molmasse der Interaktoren wurde mit Hilfe des Programms MaxQuant berechnet und die durchschnittliche Hydrophobizität in Anlehnung an Kyte und Doolittle, 1989. Um den Grad der Unordnung (Disorder) der Interaktoren zu ermitteln, wurde die DisoDB-Datenbank herangezogen, die SUPERFAMILY package version 1.73 um Proteinfaltungen nach SCOP zu klassifizieren, und sekundäre Interaktionen der Interaktoren basieren auf der HPRD-Datenbank (Keshava Prasad et al., 2009) (Dr. Stefan Pinkert).

#### 3.2.3 Zellbiologische Methoden

##### 3.2.3.1 Kultivierung und Passagierung adhärenter und semiadhärenter Zelllinien

Die verwendeten adhärenten (N2a- und HeLa-Zellen) und semiadhärenten (HEK293T-Zellen) Zellen wurden in beschichteten Kulturgefäßen in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium mit 10 % fötalem Kälberserum unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 2 mM nichtessentiellen Aminosäuren und 100 IU/ml Penicillin G und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin in einer wasserdampfgesättigten 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden stets im Verhältnis 1 : 2 neu ausgesät, so dass je nach Geschwindigkeit der Zellteilung bei verschiedenen Zelllinien Konfluenz bereits nach einem Tag (HEK293T und HeLa) oder drei bis vier Tagen (N2a) erreicht wurde. Um die Zellen von der Unterlage abzulösen, wurden sie im Falle der Kultivierung in einer 550 ml Flasche einmal mit 15 ml steriles PBS ohne Calcium- und Magnesiumionen gewaschen und mit 5 ml einer EDTA-Trypsin-Lösung versetzt. Befanden sich nur noch ca. 30 % der Zellen am Boden des Kulturgefäßes im adhärenten Zustand, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 5 ml 10-DMEM durch das darin enthaltene FCS gestoppt. Die Zellsuspension mit etwaigen Zellklumpen wurde durch fünfmaliges Triturieren homogenisiert und 1:2 verdünnt in ein neues Zellkulturgefäß überführt (Thomas and Smart, 2005 und in Anlehnung an ATCC).

### ***3.2.3.2 Kryokonservierung und Revitalisierung mammalischer Zellen***

Für die Konservierung mammalischer Zellen wurden diese mit einem Konfluenzgrad von 80 bis 90 % aus einem 550 ml Kulturgefäß wie unter 3.2.3.1 beschrieben mit PBS gewaschen, trypsiniert, mit 5 ml 10-DMEM versetzt und trituriert. Danach wurde die Zellsuspension für 5 min. bei 386 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml Kryomedium resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein steriles Kryoröhrchen überführt und für 2 h bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden dann sukzessive bei niedrigeren Temperaturen gelagert: Ein Tag bei -80 °C und schließlich für die Langzeitkonservierung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff (Frankham et al., 2002). Um zu überprüfen, ob die Kryokonservierung erfolgreich war, wurde ein Aliquot der Charge aufgetaut und ausgesät. Dazu wurden die Zellen vom Kryoröhrchen in 10 ml des vorgewärmten Medium transferiert, für 5 min. bei 386 g abzentrifugiert, um überschüssiges DMSO des Kryomediums zu entfernen. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet resuspendiert und mit 25 ml 10-DMEM in eine vorbereitete Zellkulturflasche pipettiert. Ablage und Entnahme von kryokonservierten Zellen in den Stickstofftank wurde in einem Logbuch dokumentiert.

### ***3.2.3.3 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer***

Zur Bestimmung der Zellzahl mammalischer Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer (improved) verwendet. Die Höhe der Zählkammer beträgt 0,100 mm, die zu befüllende Fläche 0,0025 mm<sup>2</sup> pro Kleinquadrat, wenn das Deckglas abschließend so aufgesetzt wurde, dass Newton'sche Ringe sichtbar wurden. Die unter 3.2.3.1 erhaltene Zellsuspensionen wurden 1:5 mit Trypanblau verdünnt, neben dem Deckglas aufpipettiert, so dass sie durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gezogen wurden. Gezählt wurden nicht durch Trypanblau angefärbte (vitale) Zellen, pro Zellzählung vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Dieser Mittelwert wurde mit dem Verdünnungsfaktor (hier 5) und  $1 \cdot 10^4/\text{ml}$  multipliziert und damit die in einem Milliliter der Suspension erhaltenen vitalen Zellen ermittelt.

### ***3.2.3.4 Transiente Transfektion mammalischer Zellen via Elektroporation***

Die zu transfizierenden Zellen wurden wie oben unter 3.2.3.1 beschrieben trypsiniert, vereinzelt und gezählt. Es wurden pro Transfektion und Vektor 0,5 Millionen bis 10 Millionen Zellen transfiziert. In 1,5 ml Eppendorf-Gefäße wurden Expressionsplasmide mit den entsprechenden DNS-Sequenzen für das zu exprimierende Protein vorgelegt; die Menge variierte je nach Experiment zwischen 0,1 µg und 90 µg endotoxinfreien Plasmiden aus Maxi-

Präparationen (s. 3.2.1.9). Da die Plasmid-Konzentration stets auf 1 µg/µl eingestellt war, entsprachen die Massenangaben auch dem Volumen in µl. Ausgehend von der Zellzählung wurde ein der Gesamtzellzahl für dieses Experiment entsprechendes Volumen plus einer Zellzahl für eine weitere imaginäre Transfektion bei 386 g für 5 min. bei RT zentrifugiert. Während der gesamten Prozedur wurde stets mit der imaginären Probe gerechnet, um genügend Zellen zur Verfügung zu haben. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das erhaltene Zellpellet in 400 µl 25-DMEM pro zu transfizierender Probe aufgenommen. 25-DMEM wurde verwendet, um den Zellen während der Elektroporation und in den Minuten danach eine möglichst stressfreie Umgebung zu bieten. Die 400 µl Zellsuspension wurde nun zu den vorgelegten Plasmiden gegeben und durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Dann wurde diese DNS/Zellsuspension in eine Küvette des Durchmessers 4 mm appliziert und der Elektroporation bei HEK293T-Zellen unter folgenden Parametern unterzogen: U = 240 V; R = ∞; C = 950 µF (modifizierte Methode nach Melkonyan et al., 1996). Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 10 ml 10-DMEM gegeben und bei 386 g für 5 min. bei RT abzentrifugiert, die erhaltenen Zellpellets in 1,0 ml 10-DMEM aufgenommen (oder entsprechend einem Vielfachen, wenn die Proben separiert werden sollten) und ausgesät. Die Zellen wurden dann je nach Versuch 6 h bis 72 h bei 37 °C kultiviert.

### **3.2.3.5 Transiente Transfektion mammalischer Zellen via Lipofektion**

Bei der Lipofektion wird Nukleinsäure mit Hilfe von Liposomen, Vesikeln, welche sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle eingebracht (Felgner et al., 1987). Zellen, welche für die Lipofektion vorgesehen waren, wurden 24 h vor der Transfektion in 10-DMEM ausgesät. Dabei wurde die Zellzahl (s. 3.2.3.3) je nach Größe der Kulturgefäße so gewählt, dass die Zellen am folgenden Tag zu 70 % bis 90 % konfluent waren. Die Zellen wurden vor der Transfektion einmal mit PBS gewaschen und mit 1 µg bis 30 µg endotoxinfreier Plasmide – je nach Größe der Kulturgefäße – in Lipofectamin und in manchen Fällen mit Plus Reagenz in OptiMEM versehen. Die Zellen wurden hiernach für drei bis acht Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend dem Transfektionsmedium ein äquivalentes Volumen 10-DMEM addiert und die Zellen bei 37 °C kultiviert.

### **3.2.3.6 Transfektion und Vorbereitung der Zellen für eine MTT-Messung**

Es wurden pro Transfektion  $4 \cdot 10^6$  Zellen eingesetzt und 30 µg endotoxinfreie Plasmide. Die Prozedur folgte der bereits unter 3.2.3.4 Transfektion beschriebenen Methode. Die nach Elektroporation und Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden in 4,2 ml 10-DMEM aufgenommen, resuspendiert und je 2,0 ml in ein Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführt. Dies entsprach einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro Vertiefung, so dass bei jeder Transfektion eine Doppelbestimmung durchgeführt werden konnte. 1,0 ml dieser Suspension wurde in das nächste Loch der Platte pipettiert, in welchem bereits 1,0 ml 10-DMEM vorgelegt worden waren. Auf diese Weise wurden die transfizierten Zellen sequenziell verdünnt, so dass schließlich folgende Zellzahlen jeder Transfektion vorlagen:  $1 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $2,5 \cdot 10^5$ ,  $1,25 \cdot 10^5$  und  $6,25 \cdot 10^4$ . In die verbleibenden Wells der letzten Reihe wurde 1,0 ml 10-DMEM Lösung zugegeben (Blindwert), die Platte wurde einige Male geschwenkt um die Zellen homogen zu verteilen und bei 37 °C im Inkubator gehalten.

### **3.2.3.7 MTT-Test**

Nach drei Tagen wurden 0,5 ml einer 0,5 mg/ml MTT-Lösung in 0-DMEM den Zellen zugesetzt. Auch in jene Wells, in denen keine Zellen ausgesät worden waren, wurde MTT-Lösung für die Bestimmung des Blindwertes gegeben. Nach einer Stunde im Inkubator bei 37 °C wurde ebenfalls 0,5 ml des Lysepuffers für den MTT-Test addiert (Shearman, 1995), die Zellen und die darin gebildeten violetten Formazan-Kristalle durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren je Well gelöst und etwaige Luftblasen beseitigt. Die Absorption des reduzierten MTTs wurde im Plate-Reader mit dem Programm KC4 bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

### **3.2.3.8 Generierung stabil transfizierter HEK293T-Zelllinien**

Um stabil transfizierte Zelllinien zu erhalten, wurden HEK293T-Zellen zunächst transient *via* Elektroporation wie unter 3.2.3.4 transfiziert. Im Falle des Vektors, welcher für das Reporterprotein Ub-EGFP codiert, wurden 4 Millionen Zellen für die Elektroporation eingesetzt und in einer sterilen Schale mit einem Durchmesser von 20 cm in 10-DMEM ausgesät, 24 h später das Medium durch 10-DMEM unter Zusatz von 1,2 mg/ml Geneticin (G418) ersetzt. Hierbei wurde die Zytotoxizität des Geneticins für eukaryotische Zellen und die Möglichkeit der intrazellulären Geneticindeaktivierung durch Einschleusung eines Neomycin-Geneticin-Resistenzgens ( $\text{Neo}^r$ ) ausgenutzt. Die für Resistzenzen gegen Geneticin

verantwortlichen Gene codieren für Aminoglykosid-Phosphotransferasen (APT), welche Geneticin an den Hydroxylgruppen phosphorylieren und damit die Wirkung der Substanz unterdrücken. Nach einer Woche wurden die Zellen von der Platte mit Hilfe einer Pipette abgelöst und in 2 ml 10-DMEM aufgenommen, die Zellen gezählt (s. 3.2.3.3) und so auf eine 96-Loch-Platte verteilt, dass statistisch gesehen nur eine Zelle alle zwei Vertiefungen ausgesät wurde. Bei einer Aussaat der Zellen in eine 96-Loch-Platte, wobei jedes Loch 100 µl fasst, bedeutet dies eine Zelldichte von 5 Zellen/ml. Dies sollte sicherstellen, dass keine Mischklone erhalten wurden. Die Zellen wurden dann in 10-DMEM mit 20 µM Geneticin propagiert, bis die Klone Platten mit 3 cm Durchmesser bedeckten. Dann wurden sie gesplittet: Die eine Passage wurde weitervermehrt, die andere biochemischen und zellbiologischen Tests unterzogen, um die Güte der Klone zu bestimmen (s. 3.2.2.5 und 3.2.3.10). Die stabile Zelllinien, welche Ub-EGFP exprimierten, wurden stets in 10-DMEM mit 1,2 mg/ml Geneticin gehalten und passagiert (Recillas-Targa et al., 2004).

Die Generation der zweiten generierten stabil transfizierten Zelllinie, bei welcher die DNS für GFP-Luciferase codierend stabil in das Genom integriert werden sollte, wurde in etwas modifizierter Weise durchgeführt. Es wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen für die Elektroporation eingesetzt und die transient transfizierten Zellen in eine Schale mit 15 cm Durchmesser in 10-DMEM ausgesät, das Medium nach 48 h abgesaugt und durch 20 ml 10-DMEM ersetzt, welchem 0,5 mg/ml Hygromycin B zugesetzt worden waren. Die Resistenz wird von einer Kinase vermittelt, welche Hygromycin B durch Phosphorylierung inaktiviert. Die Platte wurde für drei Wochen im Inkubator bei 37 °C belassen. Nachdem die Klone eine sichtbare Größe erreicht hatten, wurden 24 von ihnen unter dem Mikroskop in einer Pipette aufgenommen und in eine 24-Loch-Platte verteilt. Hier wurden die Klone ebenfalls in Selektionsmedium propagiert, bis sie Platten mit Vertiefungen des Durchmessers 3 cm ausfüllten, geteilt, um zellbiologische und biochemische Tests durchzuführen (s. 3.2.2.5 und 3.2.3.10), ob es sich um reine Klone oder Mischklone handelte und wie hoch die Expression der GFP-Luciferase ausfiel. Die stabilen Zelllinien, welche GFP-Luciferase exprimierten, wurden stets in 10-DMEM mit 0,5 mg/ml Hygromycin B gehalten und passagiert.

### **3.2.3.9 FACS: Vorbereitung der Zellen und Messung**

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann je nach Größe des Kulturgefäßes mit 0,5 ml bis 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 2 min. bei 37 °C inkubiert und die enzymatische Reaktion mit 0,5 bis 5 ml 10-DMEM gestoppt. Die Zellen wurden trituriert, für 5 min. bei 386 g abzentrifugiert, einmal in 10 ml PBS gewaschen, resuspendiert, und erneut

unter den gleichen Parametern zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 0,6 ml bis 4 ml PBS aufgenommen, durch eine Gaze direkt in ein FACS-Röhrchen gepresst und auf Eis zur Messung transportiert. Die Durchführung der Messungen erfolgte am FACS-Gerät (s. 8.1 Anhang A) in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie und folgende Parameter wurden für die Messungen gewählt: FSC und SSC in logarithmischer Skala; Acquisition and Analysis; Messung von 10.000 Zellen.

#### **3.2.3.10 FACS-Analyse und –Sortierung stabil transfizierter HEK293T-Zelllinien**

Bei beiden generierten Zelllinien konnte das exprimierte Protein aufgrund seines fluoreszierenden Anteils – EGFP im Falle Ub-EGFP und GFP im Falle der GFP-Luciferase – mit Fluoreszenz-sensitiven Methoden erfasst werden. Um zu detektieren, ob es sich bei den erhaltenen Klonen um monoklonale Zelllinien oder um Mischklone handelte, wurden diese einer durchflusszytometrischen Messung bzw. Sortierung unterzogen (Lybarger et al., 1996). Dazu wurden  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen der verschiedenen Klone zunächst in eine 24-Loch-Platte in 10-DMEM ausgesät und 6 h später das Medium gegen 10-DMEM mit 10 µM MG132 ausgetauscht; nach 24 h wurden einige der stabilen Klone mittels FACS analysiert (s. 3.2.3.9). Es wurden hier nur solche Zellen für die weitere Propagation selektiert, deren relative grüne Fluoreszenz in der 2. Dekade lagen. Es wurden Zellen, deren Volumina im Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) zwischen 320 und 1020 relativen Einheiten lagen, und deren Granularitäten, ausgedrückt durch die relative Intensität des Seitwärtsstreulichtes (sideward scatter, SSC), zwischen 10 und 900 lagen, für die Messungen ausgewählt. Diese Zellen wurden in FACS-Röhrchen sortiert und in 6-Loch-Platten weitervermehrt.

Bei den GFP-Luciferase-Klonen war das Ziel, zum einen Mischklone zu eliminieren, zum anderen wenigstens einen Klon, welcher das Protein stark exprimierte und einen Klon, der nur eine schwache Expression zeigte, zu identifizieren. Mit Hilfe zweier durchflusszytometrischer Messungen im Abstand von zwei Wochen wurde verifiziert, dass es sich um monoklonale Zelllinien handelte, deren grüne fluoreszierende Streuung um den Mittelwert gering ausfiel. Ein im Mittel stark grün fluoreszierender (3. Dekade) und ein im Mittel schwach fluoreszierender (2. Dekade) Klon wurden für weitere biochemische Kontrollen (s. 3.2.2.5) ausgewählt.

#### **3.2.3.11 Luciferase-Test *in vivo***

Transfizierte Zellen jeder Probe wurden in ein Falconröhrchen zusammen mit dem Medium überführt und bei 37 °C für 5 min. bei 386 g pelletiert, die Zellen in 1000 µl 0-DMEM

---

aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und je 400 µl in Eppendorf-Röhrchen überführt, die auf 37 °C vorgewärmt waren. Dazu wurden 400 µl ebenfalls vorgewärmtes 0-DMEM mit 10 mM Cycloheximid (CHX) gegeben, so dass die finale Konzentration an CHX 5 mM betrug, um durch Translationsstopp die Bildung neuer Reporterproteine zu verhindern. Um die Zellen vital zu halten, wurden die Proben bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm im Heizblock inkubiert, der Hitzeschock unter gleichen Bedingungen, jedoch bei einer Temperatur von  $\theta = 42$  °C, durchgeführt. Vor jeder Messung im Luminometer wurde die Zellsuspension durch Vortexen resuspendiert und anschließend 50 µl der Zellsuspension und 50 µl der Luciferin-Lösung (s. 3.1.6.2) in das Lumineszenz-Röhrchen vorgelegt, diese Suspension erneut gemischt und die Proben manuell mit einem Zeitintervall von  $t = 2$  s vermessen. Die ermittelten Werte wurden in relativen Lichteinheiten (RLUs) ausgegeben.

#### ***3.2.3.12 Immunfluoreszenz-Mikroskopie***

Um den Zellen auf zunächst unbeschichteten Deckgläsern aus Glas ein möglichst gutes Anwachsen zu ermöglichen, wurden die Deckgläser vor dem Versuch mit 0,01 % (w/v) Poly-L-lysin vorbehandelt. Diese wurden dazu für 5 min. in die Lösung eingelegt und anschließend unter sterilen Bedingungen getrocknet. Vor der Transfektion wurde eine entsprechende Anzahl von mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern in 12-Well-Platten ausgebracht, darauf 0,5 bis 1,0 Millionen transfizierte Zellen ausgesät. Die Zellen wurden bis maximal drei Tage auf den Deckgläsern kultiviert und dann entweder im Falle fluoreszierender Proteine direkt unter dem Mikroskop betrachtet oder mit Antikörpern behandelt, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert waren.

Dazu wurden die Zellen zunächst fixiert; dies geschah entweder für 5 min. mit 100 %igem MetOH, welcher auf -20 °C gekühlt war, oder für 1 Stunde mit 4 %iger Paraformaldehydlösung (s. 3.1.7.4) bei RT (Smit et al., 1974). Es wurde drei Mal für 5 min. mit PBS gewaschen und die Zellen, falls sie mit Paraformaldehyd fixiert worden waren, für 2 min. mit 0,1 %iger (v/v) Triton-X-100-Lösung permeabilisiert, hiernach zwei Mal mit PBS gewaschen und die Deckgläser mit den darauf fixierten und permeabilisierten Zellen für 1 h bei RT in 1 % PBS-B inkubiert. Die mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugierten Antikörper bzw. nicht-konjugierte primäre Antikörper (s. 8.5 Anhang E) wurden 1:100 bis 1:300 verdünnt (ausgehend von den gelieferten Stammlösungen) und die Zellen darin für 1 h inkubiert, drei Mal mit PBS gewaschen und im Falle der Zellen, welche mit einem nicht-konjugierten primären Antikörper inkubiert worden waren, mit dem korrespondierenden sekundären Antikörper mit kovalent verknüpften Fluoreszenzfarbstoff für eine weitere Stunde

inkubiert. Bei Bedarf wurde dieser Lösung auch DAPI zugesetzt (färbt die Zellkerne), welches 1:4000 zu 0,25 µg/ml aus der Stammlösung verdünnt hergestellt wurde. Nachdem die Deckgläser mit den Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie in Prolong Antifade-Medium (s. 3.1.7.3) eingebettet, um die Probe auf dem Objektträger zu befestigen und ein nachfolgendes Ausbleichen zu minimieren. Einen Tag später wurden die Ränder der Deckgläser auf dem Objektträger mit Nagellack umgeben, um Austrocknung der Proben zu verhindern, und bei 4 °C vor Licht geschützt gelagert.

Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Aufnahmen erfolgten entweder mit dem in der Abteilung vorhandenen Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M, oder in der Core Facility mit Hilfe des Leica TCS SP2 konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Für die Aufnahmen wurde ein 63x vergrößerndes Ölimmersion-Objektiv gewählt und eine virtuelle Vergrößerung von 3.0 bis 7.0 (im Falle des konfokalen Mikroskops). Weitere Einstellungsparameter: Kamera 1300 x 1030; Messung nicht-automatisch; Belichtungszeiten von 3 bis 460 ms. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Adobe Photoshop CS3 oder Leica TCS.

#### **3.2.3.13 Tetracysteinmarkierung und -detektion**

Um Proteine, Aggregate und deren Genese *in vivo* verfolgen zu können, wurde einigen der aggregierenden Proteine ein N-terminales, in Organismen höchst selten vorkommendes, Tetracysteinmotiv (-Cys-Cys-Gly-Pro-Cys-Cys-) präponiert (Griffin et al., 2000). Die mit diesem Motiv versehenen Proteine wurden in HEK293T-Zellen nach Transfektion (s. 3.2.3.4) exprimiert, auf Deckgläsern fixiert oder in 24-Well-Platten *in vivo* untersucht. Die Zellen, welche 70 % bis 90 % konfluent waren, wurden mit 2,5 µM des bisarsenidischen FlAsH-EDT<sub>2</sub> enthaltenen LumioTM-Regenzen gelöst in 0-DMEM/F12 (0-DMEM ohne roten Indikator) versehen und für 30 min. bei 37 °C geschützt vor Licht inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit 10 mM EDT in PBS gewaschen, nachfolgend zweimal in PBS. Die Proben wurden im Falle der Fixation in Medium, welches vor Ausbleichen schützt eingebettet oder im Falle der *in vivo* Detektion bis zur Untersuchung unter dem Mikroskop bei 37 °C gehalten. Anregung und Absorption wurde entsprechend der Excitationswellenlänge auf 508 nm und des Emissionsmaximums auf 528 nm eingestellt.

#### **3.2.3.14 Akridinorange-Färbung**

Akridinorange ist ein für Nukleinsäuren selektiver metachromatischer Farbstoff, um Zellzyklus oder Apoptose qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Es wurde zunächst eine

Stocklösung mit 2 mg/ml Akridinorange in ddH<sub>2</sub>O hergestellt, diese dann 1:100 in Akridinorange-Stockpuffer II (s. 3.1.7.4) verdünnt. Mammatische Zellen, entsprechend transfiziert, wurden zur Konzentration  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml in 100 µl PBS resuspendiert, anschließend wurde 0,5 ml Akridinorange-Stockpuffer I und nachfolgend Akridinorange-Stockpuffer II addiert. Schließlich wurde die verdünnte Akridinorange-Lösung hinzugefügt und geschwenkt, um die Zellen erneut zu resuspendieren ( $\beta(AO) = 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; Darzynkiewicz, 1990). Die Zellen wurden unter dem Mikroskop betrachtet und mindestens 200 Zellen pro Probe ihrer Morphologie des Zellkerns entsprechend in Kategorien eingesortiert.

#### ***3.2.3.15 Induktion von Apoptose bei HEK293T-Zellen***

Um als Positivkontrolle Apoptose bei humanen Zellen zu induzieren, wurde 6 Stunden nach Transfektion, d.h. 18 h vor Auswertung des Experimentes, TNF $\alpha$  und Cycloheximid in folgenden Konzentrationen zu den Zellen gegeben: TNF $\alpha$  50 µg/ml (finale Konzentration: 50 ng/ml); Cycloheximid: 10 mM (finale Massenkonzentration: 20 µg/ml).

#### ***3.2.3.16 Detektion amyloider Strukturen *in vivo* mittels des Fluorophors NIAD-4***

NIAD-4 ist ein niedermolekulares Fluorophor, welches wegen seiner Hydrophobizität Zellmembranen passieren kann und hier verwendet wurde, um amyloide Strukturen nachzuweisen. Zellen wurden transfiziert (s. 3.2.3.4), auf Deckgläser ausgesät und 24 h später mit dem Fluorophor NIAD-4 inkubiert. Dazu wurde das Medium mit einer 10 µM Lösung von NIAD-4 in 10 % DMSO und 90 % 1,2-Propandiol ersetzt und die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert (Nesterov et al., 2005). Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und dann direkt unter dem Mikroskop betrachtet (*in vivo*) oder sie wurden fixiert, und mit zusätzlichem Antikörper (s. 8.5 Anhang E) und DAPI behandelt, um eine Colokalisation zu ermöglichen. Die Zellen mit gebundendem NIAD-4 wurden unter dem konfokalen Mikroskop bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 475$  nm angeregt und die Bilder bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 625$  nm aufgenommen.

#### ***3.2.3.17 Detektion von Aktin mit Hilfe von Rhodamin-Phalloidin***

Die Zellen wurden genauso wie unter Immunfluoreszenzmikroskopie (3.2.3.12) beschrieben nach Transfektion ausgesät, fixiert und permeabilisiert. Vor der Addition der Antikörper wurde jedoch 165 nM Rhodamin-Phalloidin gelöst in PBS für 20 min. bei RT auf die Zellen appliziert (Verderame et al., 1980), hiernach zweimal mit PBS gewaschen und weiter wie

unter 3.2.3.12 verfahren. Die Zellen mit Rhodamin-Phalloidin wurden unter dem Mikroskop bei einer Exzitationswellenlänge von  $\lambda = 549$  nm angeregt und entsprechende Filter für die Emissionswellenlänge von 565 nm gesetzt.

#### **3.2.3.18 Detektion hydrophober Oberflächen *in situ* mit ANS**

ANS bindet an hydrophobe Oberflächen (Azzi et al., 1969) und wurde hier *in situ* verwendet, um die Hydrophobizität ausgelöst durch *de novo* Proteine zu visualisieren. ANS fluoresziert nur sehr schwach in wässriger Lösung, nach Überführung in hydrophobe Lösungen oder Bindung an hydrophobe Oberflächen wird nach Anregung zwischen 270 und 360 nm eine Fluoreszenz im blauen VIS-Bereich beobachtet ( $\lambda = 470$  nm). Die Zellen wurden wie unter 3.2.3.12 beschrieben ausgesät, fixiert, gewaschen und permeabilisiert. Hiernach wurden sie für 1 h in 1 % PBS-B blockiert und dann 1 h in 0,9 mM ANS in 50 % (v/v) PBS, 25 % (v/v) DMSO und 25 % (v/v) 1,2-Propandiol inkubiert. Die Zellen wurden dreimal für je 15 min. in PBS gewaschen und dann weiter wie unter 3.2.3.13 beschrieben eingebettet und versiegelt.

#### **3.2.3.19 Detektion von Lipidtröpfchen *in situ* mit Nilrot**

Eine Stocklösung von Nilrot mit  $\beta = 1$  mg/ml in DMSO wurde 1:1000 auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ml in DMEM/F12 ohne FCS verdünnt und die Zellen für 5 min. mit dieser Lösung inkubiert. Danach wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und wie unter 3.2.3.12 beschrieben fixiert und weiterbehandelt.

#### **3.2.3.20 Adaptierungsprozess von HEK293T-Zellen von 10-DMEM zu SILAC-Medium und Transfektion**

HEK293T-Zellen wurden über mindestens sechs Passagen einen Monat in Medium mit leichten, mittleren und schweren Aminosäuren (Arginin und Lysin) gehalten (Ong and Mann, 2006). Es wurden 40 Millionen Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (30  $\mu$ g Plasmid/10 Millionen Zellen, Dr. R. Martin Vabulas).

#### **3.2.3.21 RNSi mit Hilfe von esiRNAs**

Es wurden synthetisch hergestellte esiRNAs eingesetzt, um durch RNS-Interferenz (RNSi) die Expression von spezifischen Zielgenen, speziell Hsp110, zu verringern (Fire et al., 1998); esiRNAs stellen hocheffiziente siRNA-Populationen dar (Kittler et al., 2005). Humane Zellen wurden am Tag vor der Transfektion mit esiRNAs ausgesät, so dass sie 24 h später zu 90 %

konfluent waren. Es wurden in einer 175 cm<sup>2</sup>-Flasche 160 pmol esiRNS in 4000 µl OptiMEM durch Schütteln gemischt und der Boden der Flasche benetzt. Hierauf wurden 40 µl RNAiMAX zum esiRNS-OptiMEM Gemisch hinzugepipettiert und vermischt, die Emulsion für 20 min. bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen trypsiniert und gezählt, 16 ml Zellsuspension mit insgesamt  $5,6 \cdot 10^6$  Zellen zu der Emulsion gegeben und wiederum durch Schütteln gut gemischt (Prinzip der reversen Transfektion). Die finale Konzentration an esiRNS in der Suspension betrug nun 8,0 nmol/l. Nach drei Tagen waren die Zellen ca. 80 % konfluent und wurden für weitere Versuche (wie z. B. sekundäre Transfektion oder Analyse *per Western Blot*) vorbereitet (Kittler et al., 2007).

#### ***3.2.3.22 Nachweis oxidierender Bedingungen in viablen Mitochondrien mittels Mitotracker Red CM-H<sub>2</sub>Xros***

Um die Viabilität und Aktivität der Mitochondrien zu analysieren, wurden Zellen mit Mitotracker Red CM-H<sub>2</sub>Xros inkubiert (Poot et al., 1996) und anschließend in fixiertem Zustand immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert (s. 3.2.3.12). Dazu wurden die Zellen nach der Transfektion auf Deckgläsern propagiert und zu angegebenen Zeiten mit dem Mitotracker-Farbstoff inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und auf 37 °C vorgewärmtes DMEM/F12-Medium (farblos) mit 250 nM Mitotracker wurde für 45 min. zu den Zellen hinzugegeben. Hiernach wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem farblosem Medium gewaschen und für 1 h bei RT mit vorgewärmtem 4%igem Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurde weiter wie unter 3.2.3.12 verfahren.

#### ***3.2.3.23 Induktion von Proteotoxizität und Amyloidogenese durch Azc***

HEK293T-Zellen wurden am Tag vor dem Versuch umgesetzt, so dass sie am folgenden Tag in etwa zu 90 % konfluent waren. Es wurden in 12er Schalen 100.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät bzw. auf vorgelegte mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser. Sechs Stunden später, als die Zellen gerade wieder adhärent waren, wurde Medium durch entsprechende Lösungen mit L-Azetidin-2-carbonsäure (Azc, 2 mM aus 500 mM Stocklösung) und MG132 (10 nM und 100 nM aus 100 µM Stocklösung in DMSO) und deren Kombinationen ersetzt (Vabulas und Hartl; 2005, Loison et al, 2006), im Medium ohne zusätzliche nicht-essentielle As im Falle der Zytotoxizitätsmessung und Mikroskopie. Nach zwei Tagen wurde der MTT-Test wie oben beschrieben durchgeführt und die Zellen mit NIAD-4 (s. 3.2.3.16) gefärbt, fixiert und unter dem konfokalen Mikroskop analysiert.

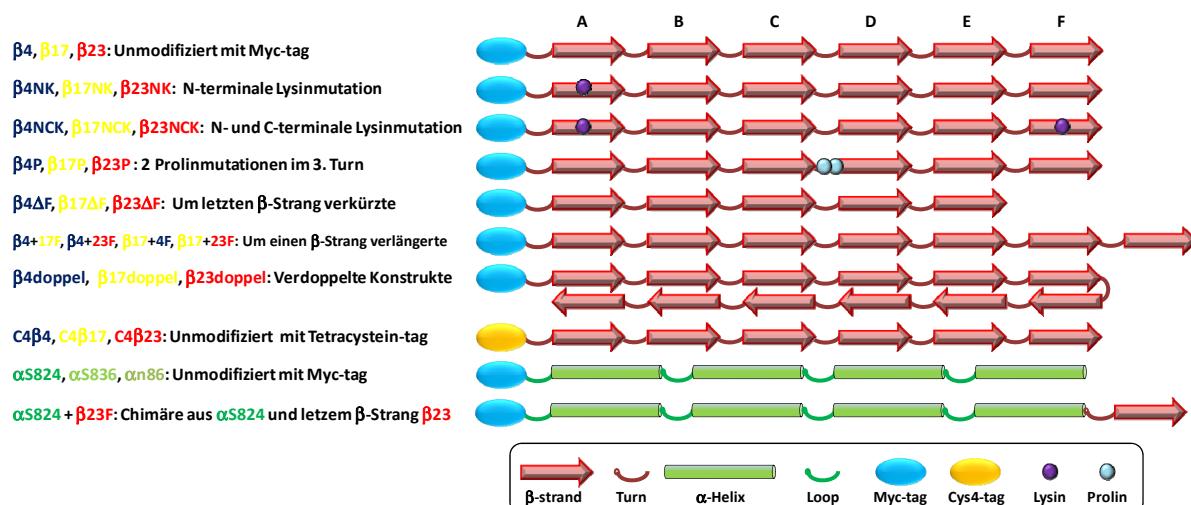
## 4. Ergebnisse

### 4.1 De novo generierte $\beta$ -Faltblattproteine als Modell für Zytotoxizität verursachende amyloide Proteine

#### 4.1.1 De novo generierte $\beta$ -Faltblattproteine und ihre Modifikationen

Die *de novo* generierten  $\beta$ -Faltblattproteine (West et al., 1999, s. auch Einleitung 2.6.1) wurden modifiziert, um *in vitro* und *in vivo* adäquate Detektionsmöglichkeiten nutzen zu können. Dafür wurden die *de novo* Proteine, sowohl die  $\beta$ -Faltblattproteine, als auch die  $\alpha$ -helikalen Proteine, mit einem N-terminalen Myc-Tag (EQKLISEEDL) versehen (s. Übersicht Abb. 4.1 und 8.6 Anhang F). Um Proteine *in vivo* verfolgen und nachweisen zu können, dass der Myc-Tag als solcher die Zytotoxizität nicht beeinflusst, wurde an die  $\beta$ -Faltblattproteine auch N-terminal ein Tetracystein- (C4-) Tag (CCPGCC) angefügt.

Daneben wurden einige andere Modifikationen der *de novo* Proteine vorgenommen, welche die Eigenschaften der Ausgangsproteine gezielt verändern sollten. Es wurden bei allen drei *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen die mittlere hydrophobe Aminosäure im ersten  $\beta$ -Strang (N-terminal) in Lysin mutiert ( $\beta$ xNK), sowie als Doppelmodifikation ein Austausch der mittleren hydrophoben Aminosäure im ersten (N-terminal) und letzten (C-terminal)  $\beta$ -Strang ( $\beta$ xNCK) zu Lysin vorgenommen, in Analogie zur Publikation Wang et al., 2002.



Zwei Glycinreste im mittleren Turn wurden in Prolin mutiert ( $\beta 4P$ ,  $\beta 17P$  und  $\beta 23P$ ). Es wurden verkürzte Versionen der drei Ausgangsproteine generiert, hierbei der letzte Turn und der letzte  $\beta$ -Strang deletiert ( $\beta x\Delta F$ , F bezeichnet den 6., also letzten,  $\beta$ -Strang). Konstrukte mit Extensionen besitzen einen zusätzlichen  $\beta$ -Strang eines jeweils anderen Proteins; folgende Konstrukte wurden hergestellt:  $\beta 4+17F$ ,  $\beta 4+23F$ ,  $\beta 17+4F$  und  $\beta 17+23F$ . Es erfolgte ebenfalls eine Duplikation der Ausgangssequenzen, der Myc-Tag und flankierende Sequenzen sind dabei nur einmal N-terminal angefügt. Die drei  $\alpha$ -helikalen *de novo* generierten Ursprungsproteine wurden ebenfalls mit einem N-terminalen Myc-Tag versehen, zudem eine Chimäre aus dem  $\alpha$ -helikalem Protein  $\alpha S824$  und dem letzten  $\beta$ -Strang  $\beta 23F$  kreiert (s. Abb. 4.1 und 8.6 Anhang F).

#### 4.1.2 Physiko-chemische Eigenschaften und Homologien der *de novo* generierten Proteine

Bei den hier betrachteten physikalisch-chemischen Charakteristika der Proteine wurde stets der Myc-Tag miteinbezogen, da die Proteine in dieser Form exprimiert und analysiert wurden und damit der Vergleich mit den experimentellen Daten vereinfacht wird. Die originalen *de novo*  $\beta$ -Faltblatt-Proteine bestehen inklusive Myc-Tag aus 80 Aminosäuren, wobei sich hydrophobe und hydrophile Aminosäuren, wie nach dem Prinzip des Designs zu erwarten, die Waage halten (s. Abb. 4.2).

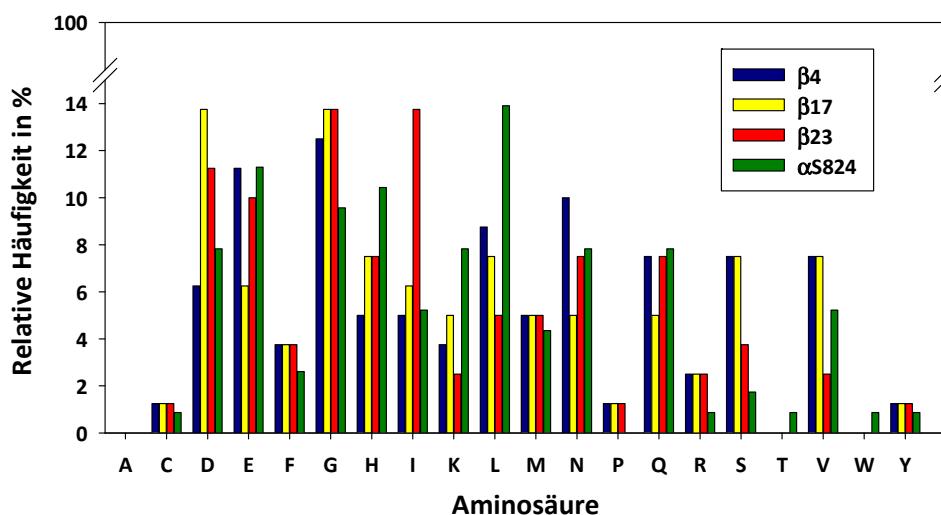
**Tab. 4.1: Übersicht über einige physikalisch-chemische Eigenschaften der *de novo* Proteine mit Myc-Tag.**

Parameter	$\beta 4$	$\beta 17$	$\beta 23$	$\alpha S824$
Molmasse (g/mol)	8943,9	8864,8	9044,9	13404,0
Anzahl As	80	80	80	115
1 mg = x pmol	111,8	112,8	110,6	74,6
1 A <sub>280</sub> (mg/ml)	6,39	6,33	6,46	1,89
Isoelektrischer Punkt (theoretisch)	4,47	4,50	4,26	5,41
Ladung bei pH 7	- 8,43	- 9,11	- 12,10	- 10,10

Die individuellen Aminosäuren in dem hydrophilen/hydrophoben Muster variieren jedoch, wobei einige Aminosäuren bei den verschiedenen *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen in besonders hohem Prozentsatz vertreten sind: Bei  $\beta 4$  sind dies besonders Glutamat, Glycin und Asparagin;  $\beta 17$  besitzt einen hohen Anteil an Aspartat und Glycin; bei  $\beta 23$  fallen die hohen Prozentsätze an Aspartat, Glutamat und Isoleucin auf, was die hohe negative Nettoladung des Proteins  $\beta 23$  von - 12,1 im Vergleich zu - 8,4 bei  $\beta 4$  und - 9,1 bei  $\beta 17$  bedingt.  $\beta 23$  besitzt

wegen seines hohen Isoleucinanteils auch die meisten verzweigten Aminosäurereste; Isoleucin weist sowohl nach Kyte-Doolittle (Kyte und Doolittle, 1984) mit 4,5 als auch nach der Eisenberg-Consensus-Skala (ECS) mit 1,4 (Eisenberg, 1984) den höchsten (positiven) Hydropathieindex auf.

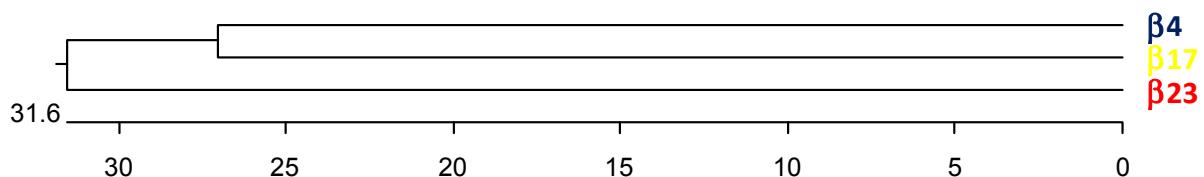
Cystein ist bei allen *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen nur einmal vertreten, was die intramolekulare Cystinbildung ausschließt, intermolekulare Disulfidbrücken wären jedoch möglich. Es wurden beim Design der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine alle Aminosäuren eingeplant, mit Ausnahme von A, T, W und C, beim  $\alpha$ -helikalen Protein alle Aminosäuren außer A und C. Bei den Proteinen, die hier tatsächlich eingesetzt wurden, ist zu berücksichtigen, dass je ein C im Myc-Tag enthalten ist.



**Abb. 4.2:** Relative Häufigkeiten der in den *de novo* Proteinen vertretenen Aminosäuren.

Die relative Häufigkeit in % bezieht sich auf die *de novo* Proteine inklusive Myc-Tag.

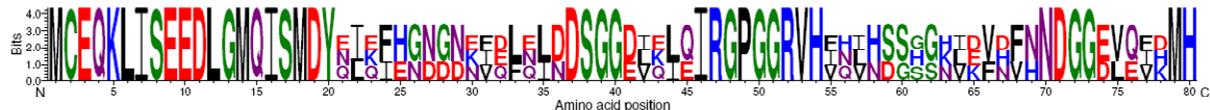
Homologien zwischen den drei *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen sind hoch, bedingt durch das Design der Proteine. An Positionen, bei welchen ein konservativer Austausch möglich ist, stehen sich  $\beta 4$  und  $\beta 23$  (70,0 %) näher als  $\beta 17$  und  $\beta 23$  (68,8 %), noch ähnlicher sind jedoch  $\beta 4$  und  $\beta 17$  mit 72,5 % Ähnlichkeit.



**Abb. 4.3:** Phylogenetischer Baum der drei *de novo* Proteine  $\beta 4$ ,  $\beta 17$  und  $\beta 23$ . Die Bezeichnung phylogenetisch bezieht sich hier nur auf die Verwandtschaft in Übereinstimmung der Aminosäuren, eine evolutionäre Verwandtschaft ist wegen des Designs nicht gegeben. Er visualisiert, dass  $\beta 4$  und  $\beta 17$  eine höhere Übereinstimmung der Aminosäuren besitzen als diese zu  $\beta 23$ .

Der hohe Prozentwert von 91,3 % der Konsensus-Positionen aller drei Proteine ist darauf zurückzuführen, dass bei allen Positionen zwei ähnliche Proteine gegen ein Unähnlicheres verglichen wurden.

Bezieht man sich auf die Identitäten inklusive Myc-Tag, bei welchen die Aminosäuren exakt übereinstimmen müssen, sind diese am größten zwischen  $\beta 4$  und  $\beta 17$  (61,3 %), gefolgt von  $\beta 17$  und  $\beta 23$  (57,5 %), am kleinsten sind sie zwischen  $\beta 4$  und  $\beta 23$  (56,3 %).



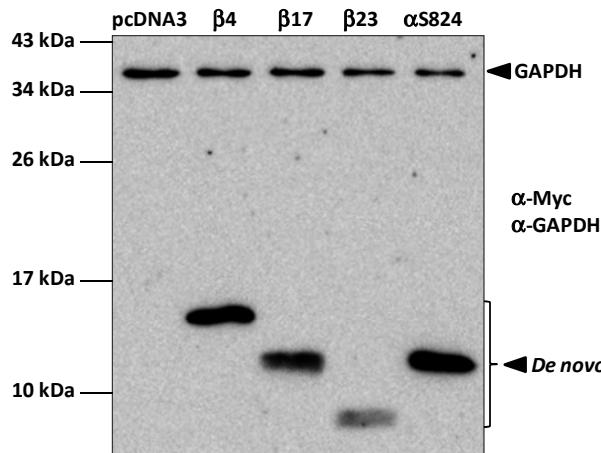
**Abb. 4.4: Sequenzlogos der drei  $\beta$ -Faltblattproteine mit Myc-Tag.** Die Höhe jeder Aminosäure wird proportional zu ihrem Vorkommen angelegt, wobei die Aminosäuren so übereinander sortiert werden, dass die am häufigsten Vorkommende oben steht (Schneider und Stephens, 1990). Der Informationsgehalt ist in „Bits“ dargestellt und stellt den Grad der Konserviertheit für jede Stelle dar. Hydrophobe Aminosäuren sind schwarz dargestellt, hydrophile grün, saure rot, basische blau und amidierte Säuren violett.

Dies würde der Abstufung der Toxizität entsprechen (s. Ergebnisse 4.1.6). Die Identität zwischen allen drei *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen liegt bei 48,8 %. Homologien zu humanen Proteinen mittels BLAST konnten bei keinem der *de novo* Proteine nachgewiesen werden.

#### 4.1.3 Expression der *de novo* Proteine in humanen Zellen: Die apparente Molmasse unterscheidet sich von der tatsächlichen in der SDS-PAGE

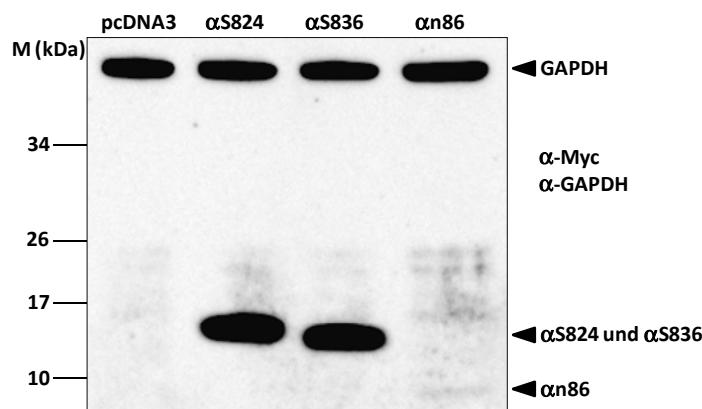
Die *de novo* Proteine wurden in HEK293T-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Die Proteine wurden im Allgemeinen in ausreichend hohen Niveaus exprimiert, so dass diese gut im Western Blot oder Dot Blot nachgewiesen werden konnten. Aus dem Western Blot (Abb. 4.5) wird ersichtlich, dass die *de novo* Proteine exprimiert wurden, jedoch nicht in gleicher Menge, wie nach gleichen Transfektionsbedingungen, Wachstumsbedingungen und Lysebedingungen angenommen werden könnte. Die Proteine  $\beta 23$  und auch  $\beta 17$  wurden meistens geringer exprimiert als  $\beta 4$  und  $\alpha S824$ . Die GAPDH-Expression als Kontrollprotein waren bei allen Experimenten in etwa gleich (s. auch Abbildungen 4.6 oder 4.7), so dass dieses Haushaltsprotein als Marker für gleichmäßige Beladung der SDS-Gele/Western Blots herangezogen werden konnte. Ein weiterer Unterschied fällt auf: Obwohl die *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine ähnliche Molmasse besitzen ( $\beta 4 = 8943,9$  g/mol,  $\beta 17 = 8864,8$  g/mol,  $\beta 23 = 9044,9$  g/mol) wiesen sie doch ein stark unterschiedliches Laufverhalten während der SDS-PAGE auf. Demnach zeigten die Proteine mit  $\beta 4$  bei ca. 16 kDa,  $\beta 17$  bei ca. 13 kDa und  $\beta 23$  bei ca. 8 kDa unterschiedliche apparente Molmassen. Nur das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha S824$  stimmte hier in seiner apparenten Molmasse von ca. 13 kDa mit der berechneten Molmasse von 13404,0 g/mol überein (s. auch Abbildungen 4.5 oder 4.6). Eine Degradation der Proteine durch das UPS oder Autophagie konnte als Ursache ausgeschlossen werden (s. Abschnitt 4.1.13). Die Expression der  $\alpha$ -helikalen *de novo* Proteine 24 h nach Transfektion zeigte (s.

Abb. 4.6), dass  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836 zu gleichen Mengen exprimiert wurden und auch in etwa die gleiche erwartete apparente Molmasse von 13 kDa aufwiesen.



**Abb. 4.5: Expression der *de novo* Proteine und ihre Darstellung im Western Blot.** HEK293T-Zellen wurden mit 30  $\mu$ g Plasmiden, welche codierende Sequenzen der *de novo* Proteine enthielten, durch Elektroporation transfiziert und 24 h später in Gegenwart von  $\beta$ -ME lysiert. 20  $\mu$ l der Lysate wurde pro Spur auf einem 15 %igen SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Die erhaltene Western Blot-Membran wurde mit  $\alpha$ -Myc und  $\alpha$ -GAPDH inkubiert.

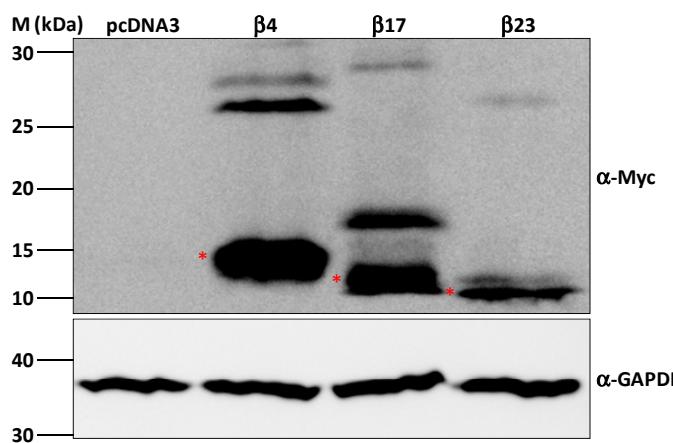
Anders das *de novo* generierte  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ n86: Dieses wurde kaum exprimiert, zeigte jedoch die erwartete apparente Molmasse und es waren schwache Banden mit der apparenten Molmasse 14 kDa, 21 kDa und 24 kDa zu erkennen. Die GAPDH-Intensitäten waren bei allen drei *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteinen in etwa gleich.



**Abb. 4.6: Expression der  $\alpha$ -helikalen Proteine in HEK293T-Zellen.** HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden codierend für die  $\alpha$ -helikalen Proteine transfiziert, nach 24 h lysiert (in Gegenwart von  $\beta$ -ME) und die Proteine via SDS-PAGE im 15 %igen Gel und Western Blot analysiert. Die *de novo* Proteine wurden mit einem  $\alpha$ -Myc-Ak detektiert, das Kontrollprotein GAPDH mit dem entsprechenden  $\alpha$ -GAPDH-Ak.

Die Western Blots der Abbildungen

4.5 und 4.6 zeigen die Auftrennung der Lysate der *de novo* Proteine in Gegenwart von  $\beta$ -ME.

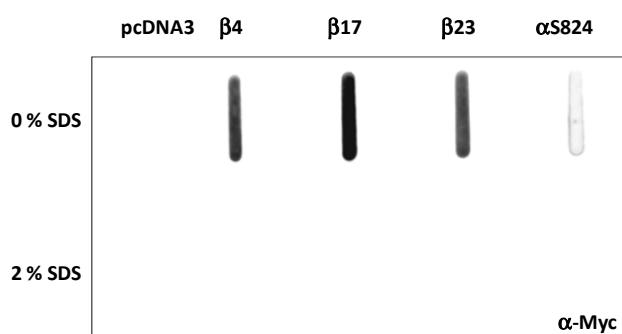


**Abb. 4.7: Oligomerbildung der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine in Abwesenheit eines reduzierenden Agens.** Zellen wurden transfiziert, ohne  $\beta$ -ME oder DTT lysiert und einer SDS-PAGE in 12 %igem Gel und Western Blot unterzogen. Es wird hier ein Bandenmuster oberhalb der bereits beschriebenen Größen der *de novo* Proteine sichtbar, das wahrscheinlich auf Oligomerisierung der Proteine zurückzuführen ist; \* markieren die Monomere der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine.

Wurde die Lyse jedoch in Abwesenheit eines reduzierenden Agens durchgeführt, so ergab sich ein anderes Auftrennungsmuster, wie in Abb. 4.7 gezeigt. Es zeigte sich auch bei dieser SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot eine Größenabstufung der Proteine, die hier in dem 12 %igen Gel etwas geringer ausfielen als in dem 15 %igen von Abb. 4.5. Auffällig ist jedoch, dass sich ohne β-ME Banden oberhalb der Banden der Monomere von β4, β17 und β23 befinden, von der Größe her würden Dimere zumindest für β4 in Frage kommen. Da sich die apparente Molmasse der *de novo* β-Faltblatt-Proteine selbst in denaturierenden SDS-PAGEs von der erwarteten unterschied, ist auch ein Unterschied Dimere und evtl. Trimere betreffend, nicht ausgeschlossen.

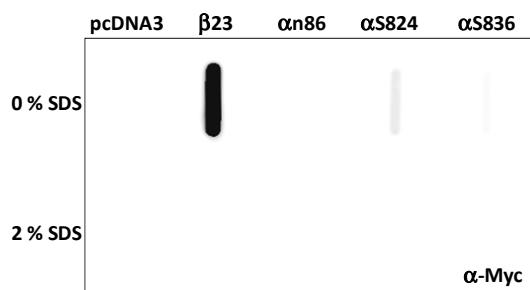
#### 4.1.4 *De novo* β-Faltblattproteine aggregieren *in vivo*

Um die Löslichkeit der *de novo* β-Faltblattproteine im Vergleich zu dem *de novo* α-helikalen Protein αS824 zu analysieren, wurden unter nativen Lysebedingungen erhaltene Zelllysate einem Filterretardationstest unterzogen. Gleiche Proteink Mengen wurden dabei durch eine 0,2 μm-porige Membran unter Vakuum filtriert und nachfolgend wie ein Western Blot behandelt. Unlösliches Material war dann mit einem entsprechenden Ak detektierbar, lösliches Material aus dem Lysat passierte den Filter.



**Abb. 4.8: *De novo* β-Faltblattproteine werden im 0,2 μm Filter retardiert.** 24 h nach Transfektion von HEK293T-Zellen wurden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert und gleiche Mengen an Lysat nach Proteinkonzentrationsbestimmung geteilt, einmal mit PBS, einmal mit SDS-Puffer versetzt und durch die Zelluloseacetatmembran unter Vakuum filtriert.

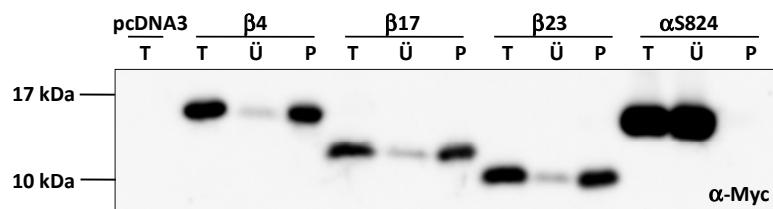
Aus Abb. 4.8 wird ersichtlich, dass große Mengen der *de novo* β-Faltblattproteine nicht löslich waren und unter nativen Bedingungen im Filter retardiert wurden. Es fand sich wie erwartet kein Signal in der Kontrolle, jedoch ein (sehr schwaches) Signal im Falle des α-helikalen Proteins.



**Abb. 4.9: *De novo* α-helikale Proteine bilden überwiegend lösliches Material.** Nach Zelllysis unter nativen Bedingungen wurden die Lysate nativ oder mit final 2 % SDS auf die Membran mit 0,2 μm Porenweite aufgetragen. Nur die Probe β23 lieferte ein ausgeprägtes Signal, bei den anderen Proben war nur ein sehr schwaches Signal detektierbar.

Mit 2 % SDS versetzte Proben zeigten kein Signal auf der Membran, weder die *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine noch das  $\alpha$ -helikale  $\alpha$ S824. Der Filter-Retardationstest in Abb. 4.9, bei welchem alle drei *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteine mit Myc-Tag aufgetragen wurden, verdeutlicht, dass alle drei kein, oder im Falle  $\alpha$ S824 nur ein minimales, Signal gaben, also auch das native Lysat nahezu vollständig die Membran passieren konnte. Allerdings muss beachtet werden, dass  $\alpha$ n86 sowohl im Western Blot (Abb. 4.6) als auch bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nur ein schwaches Signal lieferte bzw. nur wenige Zellen ein starkes Signal emittierten (Abb. 4.13).

Eine andere Methode um die Löslichkeit von Proteinen zu ermitteln und Aggregate nachzuweisen, ist die Ultrazentrifugation. Diese Methode wurde hier ebenfalls unter Einsatz von nativen Lysaten angewendet.



zentrifugiert. Gleiche Volumina an Gesamtprotein (T), Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden aufgetragen und mittels Western Blot analysiert.

Der resultierende Western Blot nach Ultrazentrifugation des Lysates mit *de novo* Proteinen zeigte (Abb. 4.10), dass bei  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 der überwiegende Proteinanteil im Pellet zu finden war, während beim  $\alpha$ -helikalen Protein der gegensätzliche Fall zutraf: Hier fand sich der größte Anteil im Überstand, lediglich ein minimaler Anteil wurde präzipitiert. Es wird wiederum deutlich, dass vom  $\alpha$ -helikalen Protein  $\alpha$ S824 am meisten synthetisiert wurde, gefolgt von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23.

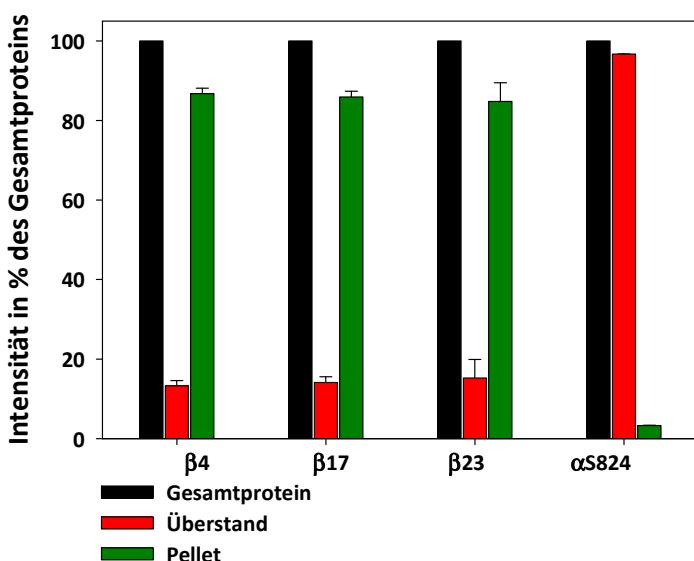


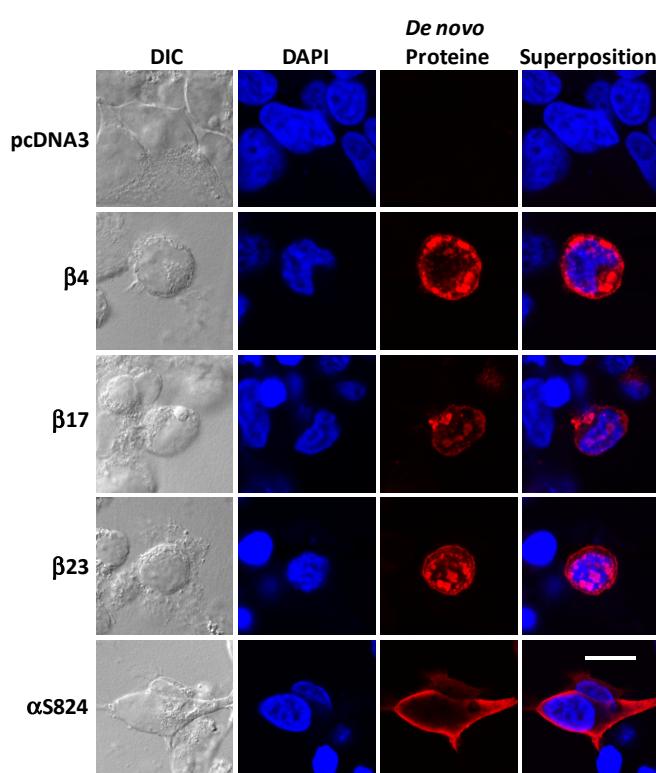
Abb. 4.10: *De novo* amyloide Proteine finden sich überwiegend in der Pelletfraktion, während  $\alpha$ S824 größtenteils im Überstand angereichert ist. Nach Transfektion und Lyse unter nativen Bedingungen wurden 30  $\mu$ g jeder Probe bei 1·10<sup>5</sup>g

Auswertung und Quantifizierung dreier unabhängiger Experimente lieferte die Abb. 4.11. Aus Abb. 4.11 geht auch hervor, dass die Anteile an Überstand und Pellet bei

Auswertung und Quantifizierung dreier unabhängiger Experimente lieferte die Abb. 4.11. Aus Abb. 4.11 geht auch hervor, dass die Anteile an Überstand und Pellet bei

den drei *de novo* Proteinen nicht signifikant voneinander abwichen. Nachdem festgestellt worden war, dass die *de novo*  $\beta$ -Faltblatt Proteine unter nativen Bedingungen mehr unlösliches als lösliches Material aufwiesen, wurden die Proteine in Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen.

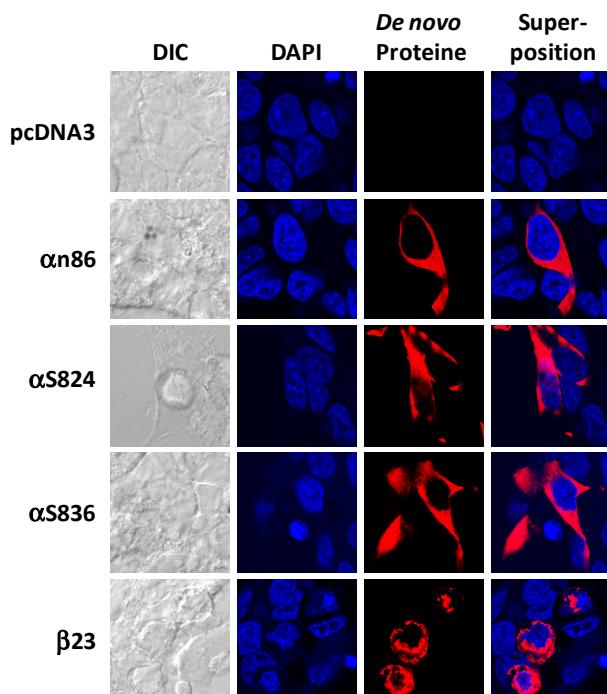
Abb. 4.12 zeigt die *de novo* amyloiden Proteine in Aggregaten indirekt durch Bindung des  $\alpha$ -Myc-Ak, welcher mit dem Fluorophor Cy3 konjugiert ist. Die Aggregatgröße variierte ca. zwischen 0,5  $\mu\text{m}$  bis 5  $\mu\text{m}$  und auch die Zahl der Aggregate war variabel, sowohl das gleiche Protein betreffend (z.B. verschiedene Zellen mit  $\beta$ 4 transfiziert), als auch zwischen den unterschiedlichen *de novo* amyloiden Proteinen.



**Abb. 4.12:** Amyloide *de novo* Proteine bilden Aggregate in humanen Zellen, während  $\alpha$ S824 als lösliches, homogen verteiltes Protein vorliegt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit einem  $\alpha$ -Myc-Cy3-AK inkubiert. Parallel dazu wurden die Nuklei mit DAPI angefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop angefertigt, wobei ein 63x-Ölimmersionsobjektiv verwendet wurde. In der ersten Spalte ist die Zellmorphologie im differenziellen Interferenzkontrast zu erkennen, in der letzten Spalte die Superposition der Kernfärbung und der  $\alpha$ -Myc-Cy3 markierten *de novo* Proteine. Der Balken an der unteren rechten Seite entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

Die Aggregate waren über das gesamte Zytoplasma verteilt, scheinbar willkürlich (eine Colokalisation mit anderen zellulären Kompartimenten wie z.B. Mitochondrien (s. Abb. 4.23), ER oder Golgi-Apparat (Daten nicht gezeigt) konnte nicht nachgewiesen werden, mit Ausnahme des Nukleus, s. Abb. 4.12, 4.23 oder 4.24), zudem scheint es eine gewisse Präferenz für den perinukleären Raum zu geben. Dies könnte auch durch die Morphologieänderung der mit amyloiden Proteinen transfizierten Zellen bedingt sein. Wie bereits erwähnt, war eine Colokalisation der Aggregate mit dem Nukleus nachweisbar. Da es sich um konfokale Aufnahmen handelt, ist es wahrscheinlich, dass tatsächlich Aggregate im Nukleus vorliegen und dies nicht auf eine Überschneidung verschiedener Bildebenen zurückzuführen ist. Die Anhäufung von Aggregaten im perinukleären Raum wurde auch mit Myc-konjugiertem Htt96Q beobachtet, jedoch war hier häufig ein großes Aggregat, manchmal von kleineren Satelliten begleitet, im perinukleären Raum sichtbar (s. auch unter Ergebnisse 4.3.6 und 4.3.10).

Nach Transfektion und Expression der amyloiden *de novo* Proteine änderte sich die Zellmorphologie bei einem hohen Prozentsatz der die Proteine exprimierenden Zellen: Filopodien fehlten in der Regel, die Zellen waren abgerundet und schienen damit kleiner zu sein als die Kontrollzellen, die lediglich mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren. Adhärenz war jedoch weiterhin gegeben, da die Zellen vor dem Fixieren mit 1 x PBS gewaschen wurden. Des Weiteren wurde bei den meisten Zellen deutlich, dass der Nukleus deformiert vorlag, manchmal durch Aggregate deformiert, manchmal fragmentiert, manchmal kondensiert, was bereits einen Hinweis auf Apoptose bei den Zellen gab (s. Ergebnisse 4.1.7).



**Abb. 4.13:**  $\alpha$ -helikale *de novo* Proteine  $\alpha$ n86,  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836 sind homogen über das Zytoplasma verteilt. HEK293T-Zellen wurden mit *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteinen sowie mit dem *de novo* amyloiden Protein  $\beta$ 23 transfiziert, für 24 h inkubiert, fixiert, permeabilisiert und die *de novo* Proteine indirekt mit  $\alpha$ -Myc-Cy3 nachgewiesen.

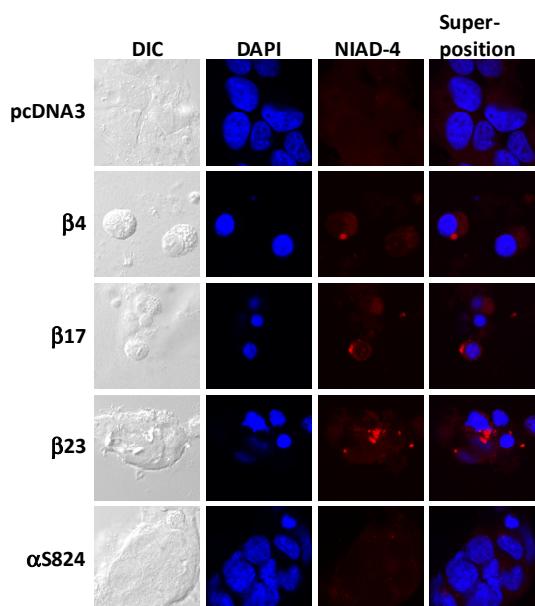
Bei  $\alpha$ -helikalen *de novo* Proteinen bot sich ein gegensätzliches Bild: Die Zellmorphologie fiel wie erwartet aus (Filopodien vorhanden, Zytoplasma um den Kern herum mit größerem Volumen, Zellkern intakt). Sie lagen im Zytoplasma homogen verteilt vor, Aggregatbildung war nicht zu beobachten, auch nicht bei starker

Überexpression. Die drei  $\alpha$ -helikalen Proteine  $\alpha$ n86,  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836 zeigten in der indirekten Immunfluoreszenz nahezu das gleiche Bild: Das exprimierte Material war löslich, homogen über das Zytoplasma verteilt, nur ein kleiner Teil schien in den Nukleus zu gelangen. Aus Abbildung 4.13 geht nicht hervor, dass die Zellen, die  $\alpha$ n86 exprimierten, in weit geringerer Anzahl vorlagen, als die  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836 exprimierenden Zellen, obwohl natürlich alle Transfektionen und nachfolgenden Prozeduren unter gleichen Versuchsbedingungen stattfanden. Dies ist kongruent zu dem Ergebnis des Western Blots in Abb. 4.6, aus welchem hervorgeht, dass  $\alpha$ n86 wesentlich geringer exprimiert wurde. Abb. 4.28 unter Abschnitt 4.1.14 könnte eine Erklärung für dieses Phänomen liefern.

Aus diesen biochemischen und zellbiologischen Experimenten geht hervor, dass die drei *de novo* amyloiden Proteine aggregieren, während die *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteine löslich in der Zelle vorliegen.

#### 4.1.5 *De novo* $\beta$ -Faltblattproteine sind amyloid: Bindung des für amyloide Strukturen spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes NIAD-4 an Aggregate in humanen Zellen

Es wurde zwar bisher gezeigt, dass die *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine Aggregate in Zellen bilden, im Filter retardiert werden und der größte Prozentsatz der Proteine nach Ultrazentrifugation in der Pellet-Fraktion zu finden war, dies war jedoch kein Nachweis für die Amyloidität der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine *in vivo*. *In vitro* konnte mit Kongorot (West et al., 1999; Andreas C. Wörner) ThioflavinT und NIAD-4 nachgewiesen werden, dass die *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine amyloide Eigenschaften aufweisen.



**Abb. 4.14:** *De novo*  $\beta$ -Faltblattproteine zeigen eine positive Reaktion mit dem für amyloide Strukturen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff NIAD-4.

Zellen wurden transfiziert, 24 h bei 37 °C inkubiert, und 10  $\mu$ M NIAD-4 in 10 % DMSO und 90 % 1,2-Propandiol wurden für eine Stunde zu den lebenden Zellen gegeben. Anschließend wurde die Lösung entfernt, die Zellen in 1 x PBS gewaschen und für 1 h mit DAPI in PBS-B inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in Mounting-Medium eingebettet und am selben Tag unter dem konfokalen Mikroskop analysiert. Die Bilder wurden mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv aufgenommen.

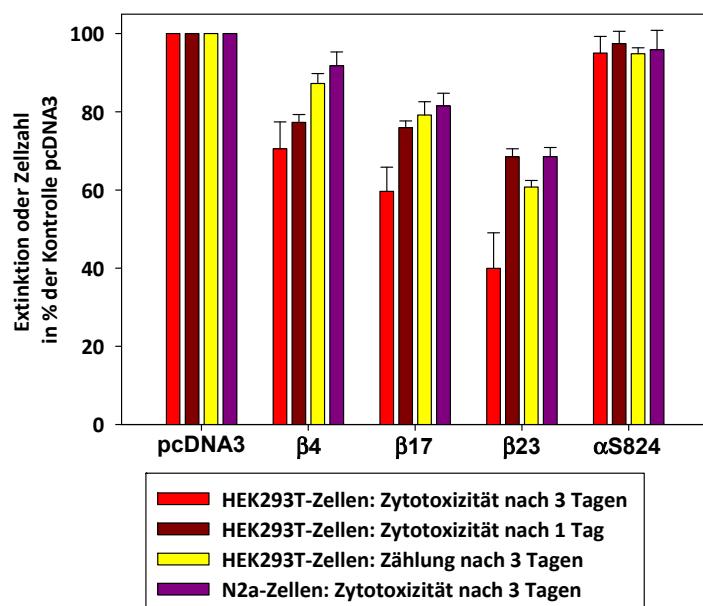
Die Färbung der mit *de novo* Proteinen transfizierten HEK293T-Zellen mit Kongorot führte zu keinem Ergebnis, auch Htt96Q, erwiesenermaßen amyloid, ließ sich nicht mit

Kongorot unter den getesteten Bedingungen anfärbten. NIAD-4 ist ein fluoreszierender Farbstoff (Nesterov et al., 2005), welcher speziell für die Detektion amyloider Strukturen *in vivo* entwickelt wurde und auch die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Mit diesem membrangängigeren Fluorophor war es möglich, amyloide Strukturen in mit  $\beta$ -Faltblattproteinen und Htt96Q (nicht gezeigt) transfizierten HEK293T-Zellen zu detektieren (s. Abb. 4.14).

Aus Abb. 4.14 geht hervor, dass Aggregate NIAD-4 banden, also in diesen Aggregaten amyloide Strukturen vorhanden waren. Im Unterschied zu Abbildungen, in denen die *de novo* Proteine mit Antikörpern visualisiert wurden, fällt hier auf, dass pro transfizierter Zelle nur wenige Aggregate mit NIAD-4 angefärbt wurden, während bei den mit Antikörpern behandelten Präparaten viele Aggregate, hauptsächlich perinuklear lokalisiert, beobachtet wurden (Abb. 4.12, nicht quantifiziert). Sowohl in der Kontrolle als auch bei den mit  $\alpha$ -helikalem Protein transfizierten Zellen wurde keine Bindung von NIAD-4 detektiert.

#### 4.1.6 De novo amyloide Proteine sind in humanen Zellen zytotoxisch

Die veränderte Zellmorphologie, verminderte Expression der  $\beta$ -amyloiden Proteine selbst, die Fähigkeit zu aggregieren und in Zellen amyloide Strukturen zu bilden, all dies legte nahe, dass die Proteine zytotoxisch sind. Als ein Maß für den inversen Parameter, die Zytoviability, kann zum einen die Zellzahl nach einer bestimmten Zeit dienen, zum anderen aber Zellviabilitätstests, die den Redoxstatus, vorhandene Reduktionsäquivalente, exprimierte Enzyme oder sekretierte Proteine messen.



**Abb. 4.15: Zellzahl und Zytoviability ist nach Expression der *de novo* amyloiden Proteine graduell verringert.**

HEK293T-Zellen wurden drei Tage (rote Balken) oder einen Tag (dunkelrote Balken) nach Transfektion mit MTT behandelt und nachfolgend die Extinktion der erhaltenen Zellsäfte gemessen. Die Extinktionen werden in % der Kontrolle, welche nur mit einem leeren Vektor transfiziert worden war, dargestellt.

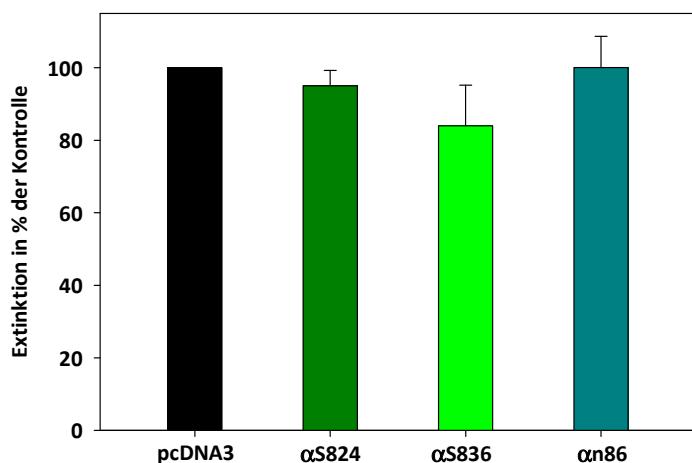
HEK293T-Zellen wurden transfiziert, drei Tage später resuspendiert und mit Trypan-Blau versetzt. Die viablen, nicht blaugefärbten Zellen wurden gezählt (gelb).

Auch von N2a-Zellen wurden MTT-Tests nach drei Tagen durchgeführt und in % der Kontrolle aufgetragen (violett).

Die Zellzahl ist eine einfach zu bestimmende Größe, die durch reines Zählen der vitalen Zellen (nicht Trypanblau gefärbt) in der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden kann. Die Zellzahl der mit den  $\beta$ -amyloiden Proteinen transfizierten Proben war drei Tage nach der Transfektion deutlich, bis auf ca. 60 % im Falle des Proteins  $\beta 23$ , reduziert (s. Abb. 4.15). Bei den beiden anderen Proteinen  $\beta 4$  und  $\beta 17$  zeigte sich ebenfalls eine verminderte Zellzahl, wohingegen das  $\alpha$ -helikale Protein eine nur kaum verminderte Zellzahl aufwies. Diese Abstufung der Zellzahl korrelierte meistens mit dem Expressionslevel der Proteine (s. Abb. 4.5):  $\beta 4 > \beta 17 > \beta 23$ .

Als ein anderer Test für Zytoviability wurde der sogenannte MTT-Test herangezogen. Dieser Test wurde zuerst und wird immer noch häufig im Themenbereich aggregierender, amyloider Proteine angewendet, um ihren zytotoxischen Einfluss auf mammatische Zellen zu analysieren (Shearman et al., 1995). MTT steht für den wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, welcher nach Reduktion in wasserunlösliche, violette Formazankristalle umgesetzt wird.

In Abb. 4.15 ist die Extinktion der Zelllysate nach MTT-Behandlung, die mit der Zellviabilität korreliert, abgebildet. Es wird deutlich, dass wieder eine graduelle Zytotoxizität, mit folgender Abstufung vorlag:  $\beta23 > \beta17 > \beta4 \gg \alpha S824$ . Auch hier entsprach die Gradierung derjenigen in Expressionsmengen (Abb. 4.5) oder bei der Zellzählung (Abb. 4.15). In Abb. 4.15 ist zudem das Ergebnis von MTT-Versuchen dargestellt, welche einen Tag nach Elektroporation der *de novo* Proteine durchgeführt wurde. Auch hier war die Zytotoxizität der *de novo*  $\beta$ -amyloiden Proteine höher als bei der Kontrolle und dem  $\alpha$ -helikalen *de novo* Protein  $\alpha S824$ , die Gradierung war die gleiche, aber die Zytotoxizität war insgesamt nach einem Tag nicht so stark ausgeprägt wie nach drei Tagen.



**Abb. 4.16: Die  $\alpha$ -helikalen Proteine  $\alpha S824$  und  $\alpha n86$  zeigen keine oder im Falle des  $\alpha S836$  nur eine minimale Zytotoxizität.**

Auch hier wurden von HEK293T-Zellen drei Tage nach ihrer Transfektion MTT-Tests durchgeführt und die Extinktionen in % der Kontrolle aufgetragen.

In Abb. 4.16 ist die Zytotoxizität der  $\alpha$ -helikalen *de novo* Proteine, mittels MTT-Test gemessen, gezeigt. Sie waren im Vergleich zu den  $\beta$ -

amyloiden *de novo* Proteinen nicht, oder im Falle des  $\alpha S836$  kaum, toxisch für die Zellen. Allerdings sind die Ergebnisse für  $\alpha n86$  vorsichtig zu bewerten, da die Expressionslevel, wie in Abb. 4.6 gezeigt, sehr niedrig waren. Dieses Ergebnis führte zu der Überlegung, dass sich  $\alpha S824$  am besten als Kontrollprotein gegenüber den amyloiden *de novo* Proteinen eignet, und zwar aus folgenden Gründen: Es wird korrekt exprimiert, es scheint nicht degradiert zu werden, die apparente Molmasse entspricht der theoretischen, es weist eine homogene Verteilung auf, die Expressionslevel scheinen ausreichend hoch zu sein und die Zellviabilität ist nach seiner Expression sehr hoch ( $95,0 \% \pm 4,3 \% \text{ im Vergleich zur Kontrolle mit } 100 \%$ ).

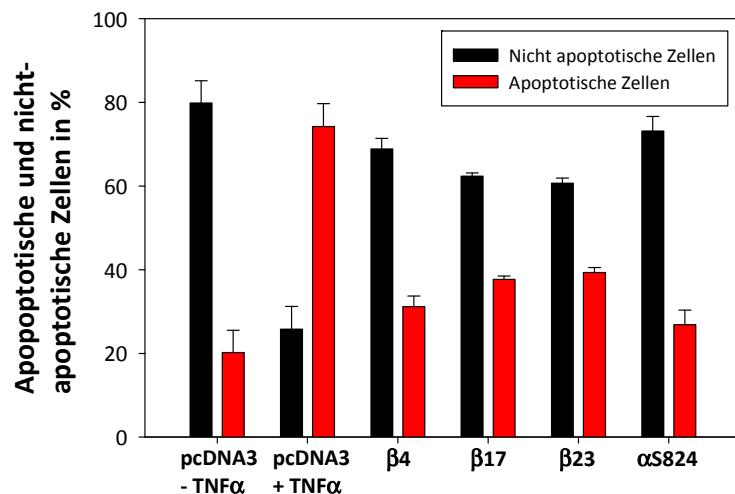
Alle gezeigten Ergebnisse wurden in HEK293T-Zellen erhalten. Es stellte sich die Frage, ob die beobachtete Zytotoxizität auch in anderen mammalischen Zellen auftritt. Um dies zu beantworten wurden N2a-Zellen, neuronale Zellen aus der Maus, ebenfalls mit *de novo* Proteinen transfiziert. Auch in N2a-Zellen (s. Abb. 4.15) erwiesen sich die *de novo* amyloiden Proteine als toxisch, die Gradierung der Zytotoxizität unter den amyloiden Proteinen ist ebenfalls mit der in HEK293T-Zellen vergleichbar, jedoch war die Zytotoxizität in N2a-Zellen geringer ausgeprägt als im System der HEK293T-Zellen.

#### 4.1.7 De novo amyloide Proteine induzieren Apoptose in humanen Zellen

Veränderte Zellmorphologie, deformierte und teilweise fragmentierte Nuklei, verminderte Zellzahl und erhöhte Zytotoxizität gaben Hinweise, dass die *de novo* amyloiden Proteine die Zellen zu einem programmierten Zelltod anregen könnten. Mit Hilfe der Akridinorange (AO)-Färbung können apoptotische Zellen von viablen Zellen unterschieden werden. AO kann an DNS im Nukleus binden, insbesondere dann, wenn die Kernmembran geschädigt ist, und besitzt dann eine Exzitationswellenlänge von  $\lambda = 502$  nm und eine Emmissionswellenlänge von 525 nm. Im Zuge der apoptotischen Prozesse tritt neben frühen Veränderungen von z.B. der Membranpolarität und Aktivierung von Caspasen eine Kondensation des Chromatins, eine Kompaktierung und Fragmentierung des Nukleus auf. Diese Stadien können mit Hilfe von AO beobachtet und analysiert werden. Als Positivkontrolle dienten hier mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, welche mit CHX und TNF $\alpha$  inkubiert wurden, um den extrinsischen Weg (Typ I) der Apoptose auszulösen.

Die Zellen wurden unter dem Mikroskop analysiert, und eine erhöhte punktförmige Fluoreszenz (Kondensation des Chromatins), Kompaktierung des Nukleus sowie Fragmentierung des Nukleus und damit der DNS wurden als apoptotisch beurteilt.

Aus Abb. 4.17 geht hervor, dass mit amyloiden Proteinen transfizierte Zellen einen höheren Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen besitzen. Auch bei den Kontrollzellen scheint es einen gewissen Anteil an Apoptose zu geben.



**Abb. 4.17: Amyloide *de novo* Proteine exprimierende Zellen zeigen einen erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen.**

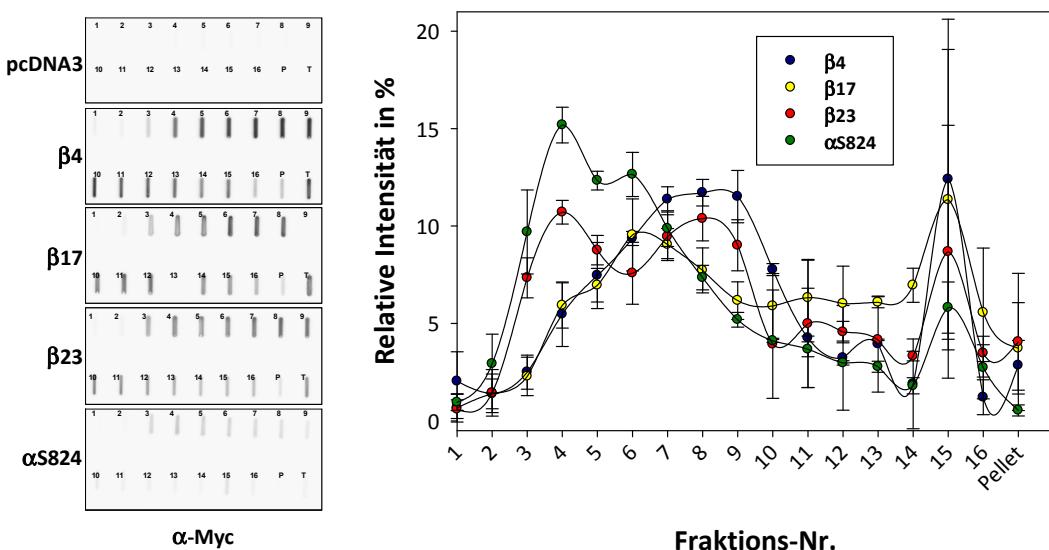
HEK293T-Zellen, welche nur mit einem leeren Plasmid transfiziert worden waren, wurden vor der AO-Färbung für 18 h mit TNF $\alpha$  und CHX inkubiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, in entsprechenden Pufferlösungen gewaschen und mit AO-Pufferlösung (1 $\mu$ g/ml AO) inkubiert. Die Zellen wurden dann quantitativ mikroskopisch ausgewertet.

Bei den Zellen, welche die *de novo* Proteine exprimierten, wurde dieser Anteil mit einberechnet. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen war damit nicht so hoch wie der Prozentsatz der Zytotoxizität (ca. 60 % im Falle des  $\beta 23$ ).

#### 4.1.8 *De novo* amyloide Proteine $\beta 4$ und $\beta 17$ zeigen eine andere Verteilung im Saccharose-Gradienten als $\beta 23$

In den Immunfluoreszenzbildern und NIAD-4-Färbungen sowie beim Filter-Retardationstest und der Ultrazentrifugation zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Aggregationsverhaltens der *de novo* amyloiden Proteine. Bei den hier durchgeföhrten Dichtegradientenzentrifugationen gab es Verteilungsunterschiede zwischen den *de novo* amyloiden Proteinen  $\beta 4$  und  $\beta 17$  gegenüber  $\beta 23$  einerseits und  $\alpha S824$  als Kontrollprotein andererseits (s. Abb. 4.18).

Die drei amyloiden Proteine wiesen einen maximalen Peak ihrer relativen Intensität, gemessen mittels Filterretardationstest, zwischen den Fraktionen 14 und 16 einerseits auf, zwischen 6 und 10 andererseits. Das amyloide Protein  $\beta 23$  wies jedoch einen zusätzlichen Peak zwischen Fraktion 3 und 5 auf, das  $\alpha$ -helikale einen maximalen Peak zwischen den Fraktionen 2 und 4. Bei allen war nur wenig  $\alpha$ -Myc-Ak-reaktives Material in der Pellet-Fraktion nachweisbar.  $\beta 23$  besitzt demnach eine Fraktion niedrigerer Sedimentationsdichte im Vergleich zu  $\beta 4$  und  $\beta 17$ .

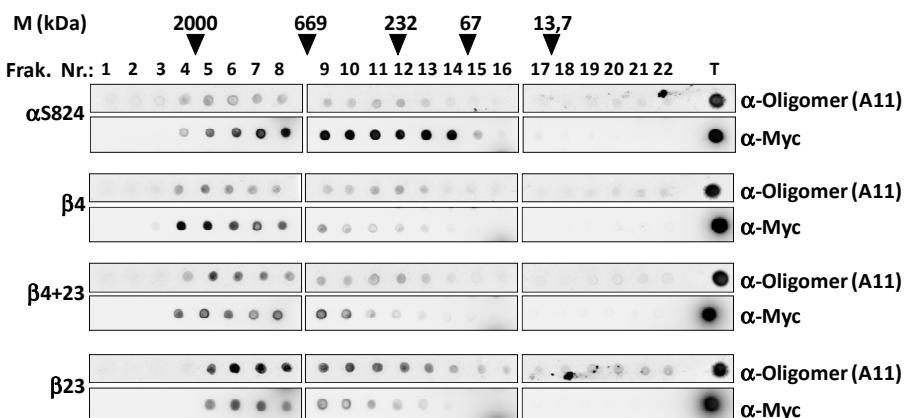


**Abb. 4.18:** Die Verteilung des *de novo* amyloiden Proteins  $\beta 23$  unterscheidet sich von derjenigen der Proteine  $\beta 4$  und  $\beta 17$ . Zellen, welche die *de novo* Proteine exprimierten, wurden 24 h nach Transfektion unter nativen Bedingungen lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Gleiche Mengen der Lysate wurden auf einen 5 % - 20 % igen Saccharose-Gradienten in PBS geladen und für 3 h bei  $2 \cdot 10^5$  g und 4 °C aufgetrennt. Es wurden 16 Fraktionen gesammelt und mit Hilfe einer Slot Blot-Apparatur auf Nitrozellulose gesogen (entspricht dem Gesamtprotein pro Fraktion). Die entsprechenden Membranen wurden dann wie ein Western Blot entwickelt (links). Der Versuch wurde wiederholt und die Prozentsätze der einzelnen Intensitäten der verschiedenen Proteine jeweils auf die integrierte Gesamtintensität normalisiert. Für die Mittelwerte der Versuche ergab sich darauf der Graph auf der rechten Seite der Abbildung.

#### 4.1.9 *De novo* amyloide Proteine zeigen eine zur Zytotoxizität korrelierende A11-Reaktivität

Die oben besprochene Dichtegradientenzentrifugation gab einen Hinweis, dass die Aggregatbildung bei den verschiedenen *de novo* Proteinen unterschiedlich verlaufen könnte und auch verschiedene stationäre Phasen der Aggregatbildung unterschieden werden könnten. Oligomere könnten eine zur Zytotoxizität entscheidend beitragende Spezies sein (s. Einleitung 2.5.3), deshalb wurde getestet, inwieweit Oligomere auch bei den *de novo* amyloiden Proteinen vorhanden waren und ob es möglicherweise einen Zusammenhang gab.

Zunächst wurde versucht, im nativen Lysat die A11-Reaktivität per Dot Blot nachzuweisen, jedoch gab es keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und den *de novo* amyloiden Proteinen (sowohl die Kontrolle als auch die transfizierten Zelllysate zeigten ein ähnlich starkes Signal, Daten nicht gezeigt). Nach der Dichtegradientenzentrifugation konnte kein Signal mit dem A11-Ak detektiert werden (wahrscheinlich waren die Proben in 12,0 ml zu verdünnt, Daten nicht gezeigt). Um den Nachteil des großen Volumens der Dichtegradientenzentrifugation zu umgehen, wurden die Zelllysate über eine Superose 6-Säule mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt.



**Abb. 4.19:** Die A11-Reaktivität korreliert mit der Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine. HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit den entsprechenden Proteinen unter nativen Bedingungen lysiert und einer Gelfiltration mittels einer Superose 6-Säule unterzogen. Aus den 22 erhaltenen

Faktionen wurde das gleiche Volumen auf Membranen aufgebracht und mit A11-Ak und α-Myc-Ak als Kontrolle detektiert und wie ein Western Blot entwickelt (T = Totallysat).

Die einzelnen Fraktionen wurden, stets auf Eis, auf eine Western Blot-Membran aufpipettiert und mit dem A11-Ak sowie zur Kontrolle mit dem α-Myc-Ak detektiert. In Abb. 4.19 sind die A11-Reaktivitäten im Dot Blot dargestellt. Es wird deutlich, dass αS824 die geringste A11-Reaktivität in allen Fraktionen aufweist, während β4 und in verstärktem Maße β4+23F und β23 eine hohe A11-Reaktivität zeigten. Das α-helikale Protein αS824 bildete zudem wie erwartet ein anderes Verteilungsmuster als die *de novo* amyloiden Proteine. Die höchsten Signalintensitäten der *de novo* amyloiden Proteine befanden sich zwischen Fraktion 4 und 9.

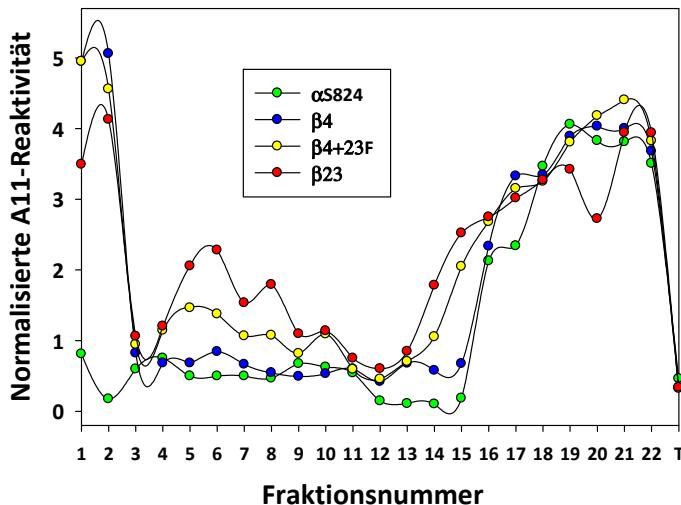


Abb. 4.20: Die normalisierte A11-Reaktivität ist bei Fraktionen mit höherer Molmasse bei *de novo* Protein  $\beta$ 23 deutlich höher als bei  $\beta$ 4+23F oder  $\beta$ 4. HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit den entsprechenden Proteinen unter nativen Bedingungen lysiert und einer Gelfiltration mittels einer Superose 6-Säule unterzogen. Aus den 22 erhaltenen Fraktionen wurde das gleiche Volumen auf Membranen aufgebracht, mit A11-Ak und  $\alpha$ -Myc-Ak als Kontrolle dekoriert und wie ein Western Blot entwickelt. Für die Normalisierung wurde die A11-Reaktivität jeder Fraktion durch die Myc-Reaktivität dividiert (T = Totallysat).

Dies korrelierte mit den nachgewiesenen A11-reaktiven Spezies. Die Molmassen, bei welchen die A11-Reaktivität am höchsten war, lagen zwischen 232 und 2000 kDa, was einer Anzahl Monomeren von 26 bis 221 pro Oligomer entspricht, vorausgesetzt, das Aggregat bestünde nur aus *de novo* Proteinen.

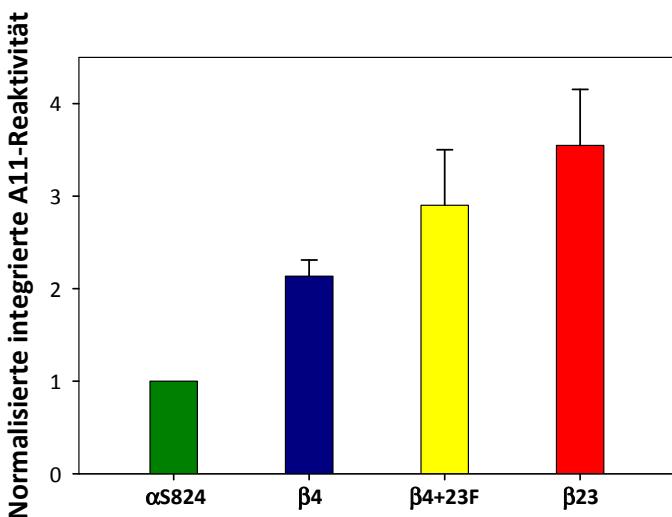


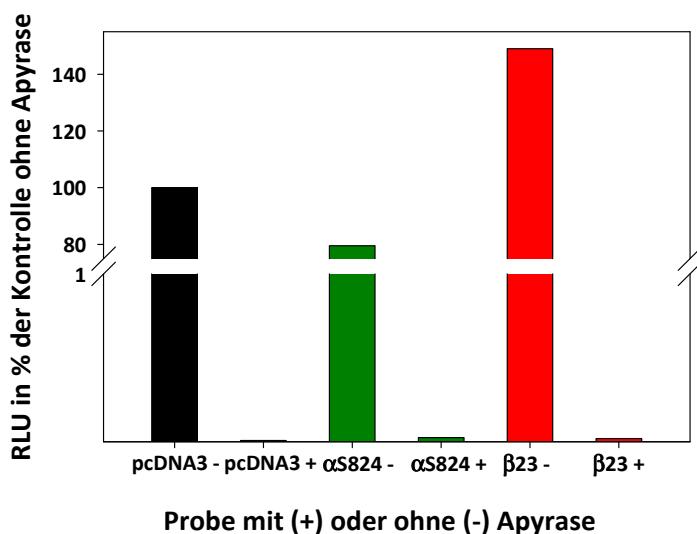
Abb. 4.21: Die normalisierte integrierte A11-Reaktivität korreliert mit der Zytotoxizität der *de novo* Proteine. Die erhaltenen normalisierten A11-Reaktivitäten wurden hier von drei unabhängigen Experimenten integriert und die Mittelwerte gebildet.

In Abb. 4.20 ist aus einem Experiment die auf die *de novo* Proteine normalisierte A11-Reaktivität gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Die

Graphen verdeutlichen, dass die normalisierte A11-Reaktivität für  $\beta$ 23 zwischen den Fraktionen 4 und 10 deutlich höher lag als für  $\alpha$ S824. Wurden die normalisierten A11-Reaktivitäten wie in Abb. 4.21 dargestellt für jedes Experiment integriert und aus den Experimenten die Mittelwerte gebildet, so ergaben sich folgende Abstufungen:  $\alpha$ S824 <<  $\beta$ 4 <  $\beta$ 4+23F <  $\beta$ 23. Diese Abstufung korrelierte stark mit den *via* MTT-Test ermittelten Zytotoxizitäten der Proteine (s. Abb. 4.15).

#### 4.1.10 Die ATP-Konzentration ist in $\beta23$ exprimierenden Zellen höher als in Kontrollzellen

Es wurden Versuche mit Apyrase durchgeführt, wobei ATP in den Zellen depletiert werden sollte, damit Hsp70/Hsc70 eventuell ihre Substrate fester binden würden (Daten nicht gezeigt). Als Kontrollexperiment zu diesem Versuch wurden die ATP-Konzentrationen in Zellen, die unter nativen Bedingungen lysiert worden waren, vor und nach Depletion von ATP gemessen. Zunächst wurde eine Kalibrationskurve erstellt, wobei die Lumineszenz bekannter ATP-Konzentrationen gemessen wurde (Kalibrationskurve nicht gezeigt). Die Zelllysate wurden geteilt, wobei ein Aliquot ohne und eines mit Apyrase inkubiert wurde. Durch serielle Verdünnung der Zelllysate wurde festgestellt, wann die RLU's der Proben im annähernd linearen Bereich der sigmoidalen Kalibrationskurve lagen und dementsprechend die Verdünnungen der Proben gewählt. Die Proben der Zelllysate wurden dann unter den gleichen Parametern (Luciferase, Luciferin, Messzeiten) wie die der Kalibrationsproben vermessen. Die ATP-Konzentration lag in den Zellen, welche zuvor mit  $\beta23$  transfiziert worden waren, über 1,5 x höher als in den Kontrollzellen mit pcDNA3 und mehr als 2 x höher als in mit  $\alpha S824$  transfizierten Zellen. Aus den Graphen geht auch hervor, dass die Depletion von ATP mit Hilfe des Enzyms Apyrase erfolgreich war und ATP bis auf einen Residualwert von ca. 0,02 % hydrolysiert wurde.



**Abb. 4.22:** Zelllysate mit  $\beta23$  weisen eine höhere ATP-Konzentration auf als Zelllysate mit pcDNA3 oder  $\alpha S824$ . HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion unter nativen Bedingungen lysiert und mit oder ohne Apyrase inkubiert. Anschließend wurde der ATP-Gehalt der Lysate in RLU gemessen, dann wurde eine Normalisierung auf den Kontrollwert der pcDNA3 ohne Apyrasebehandlung durchgeführt.

Aus den erhaltenen Werten der ATP-Konzentration in den Lysaten wurde hier versucht, die ATP-

Konzentration in HEK293T-Zellen zu berechnen. Ausgehend von der Publikation Thomas et al., 2005, wurde das Volumen einer HEK293T-Zelle als zylindrisch angenommen und folgendermaßen berechnet:

$$V = 2 \left( \frac{1}{3} \pi r^2 h \right)$$

Die Länge (h) einer HEK293T-Zelle wird mit ca. 20 µm beschrieben, die Dicke (2r) mit durchschnittlich 10 µm. Als Zellvolumen ergibt sich daraus  $1,047 \cdot 10^{-15} \text{ m}^3$  ( $\equiv 1,047 \cdot 10^{-12} \text{ l}$ ). Beispielhaft wird hier die Berechnung der ATP-Konzentration in der HEK293T-Zelle für die Kontrolle pcDNA3 dargelegt.

Aus der sigmoidalen Kalibrationskurve wurde der Wert von 164987 gemessenen RLU zu  $7,572 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$  bestimmt, mit einem Verdünnungsfaktor von 10.000 ergeben sich  $7,572 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  ATP im Zelllysat der Kontrolle. Es wurden 200 µl ( $\equiv 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ l}$ ) eingesetzt, dies entspricht  $1,514 \cdot 10^{-8} \text{ Mol ATP}$  in 200 µl. Pro Lysat und Aliquot wurden  $1 \cdot 10^7$  Zellen eingesetzt:  $1,514 \cdot 10^{-8} \text{ Mol ATP} / 1 \cdot 10^7 \text{ Zellen} = 1,514 \cdot 10^{-15} \text{ Mol ATP pro Zelle}$ . Volumen einer HEK293T-Zelle (s. oben):  $1,047 \cdot 10^{-12} \text{ l}$ .  $c(\text{ATP}) = 1,44 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ .

In gleicher Weise wurden die ATP-Konzentrationen für die Proben αS824 und β23 berechnet.

**Tab. 4.2: Experimentell bestimmte ATP-Konzentrationen in HEK293T-Zellen, welche verschiedene *de novo* Proteine exprimierten.**

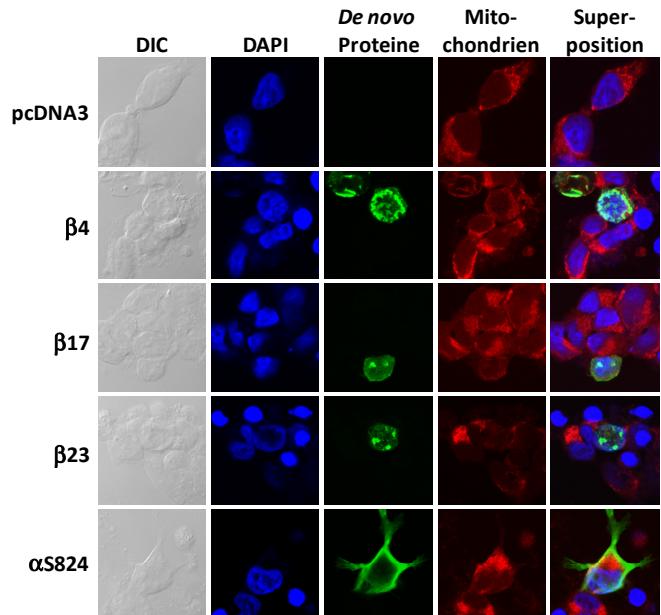
Probe	$c(\text{ATP}) \text{ in mmol/l}$
pcDNA3	1,44
αS824	1,11
β23	2,33

#### 4.1.11 *De novo* amyloide Proteine colokalisieren nicht mit Mitochondrien, vermindern jedoch ihren Oxidationsstatus

Da bei der späteren Analyse der Interaktoren der amyloiden *de novo* Proteine einige Proteine der Mitochondrien detektiert wurden, lag es nahe, auch eine mögliche Colokalisation zwischen Mitochondrien und *de novo* Proteinen zu untersuchen. Für diesen Zweck wurden die Zellen mit MitotrackerRed behandelt, einem fluoreszierenden Farbstoff, welcher spezifisch die Strukturen von Mitochondrien visualisiert. Der hier verwendete Subtyp Mitotracker Red CM-H<sub>2</sub>Xros ist ein Derivat des Dihydro-X-rosamin-Fluorophors. Die reduzierte Verbindung fluoresziert nicht, bevor sie in lebende Zellen permeiert, wo sie zu der korrespondierenden fluoreszierenden mitochondrien-selektiven Verbindung oxidiert wird und dann in den Mitochondrien sequestriert werden kann.

Abb. 4.23 stellt die mit Mitotracker Red gefärbten Mitochondrien (rot) und die *de novo* Proteine (grün) dar. Die Mitochondrien erschienen mit dem inkorporierten oxidierten MitotrackerRed als ein tubuläres Retikulum, welches sich durch die gesamte Zelle zieht, jedoch mit Präferenz zu der Seite, wo der größte zytoplasmatische Anteil der Zelle liegt. *De novo* amyloide Proteine colokalisierten nicht mit den mitochondrialen Strukturen, auch die

partielle Colokalisation des  $\alpha$ -helikalen Proteins ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass dieses über das gesamte Zytoskelett homogen verteilt vorliegt und sich mit den zytoplasmatisch lokalisierten Mitochondrien überschneidet.



**Abb. 4.23: Amyloide *de novo* Proteine colokalisieren nicht mit Mitochondrien.**

HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion der *de novo* Proteine via Elektroporation mit 250 nM Mitotracker Red CM-H2Xros für 45 min. inkubiert. Nach Waschen, Fixieren, Permeabilisieren und Blockieren mit PBS-B wurden die Zellen eine Stunde mit dem  $\alpha$ -Myc-FITC-Ak und gleichzeitig mit DAPI inkubiert. Die Aufnahmen wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop von Leica mit einem Ölimmersionsobjektiv, 63x vergrößernd, erstellt.

Mit der Benutzung des CM-H<sub>2</sub>Xros wurde gleichzeitig ein zweiter Aspekt der Beziehung *de novo* Proteine mit Mitochondrien beleuchtet, nämlich ob

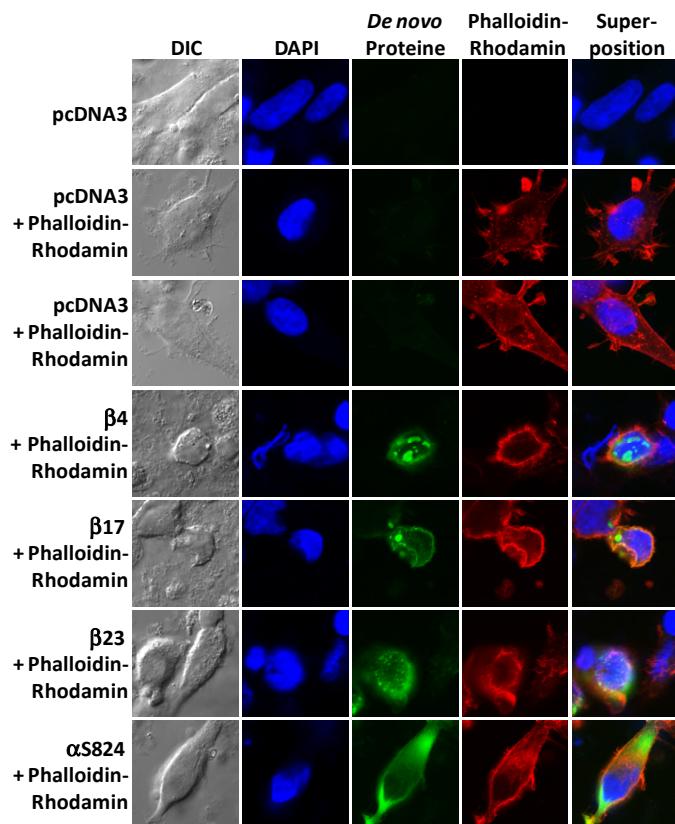
die Mitochondrien in *de novo* Proteine exprimierenden Zellen vital sind. Aus den obigen Bildern wird deutlich, dass Zellen, welche amyloide *de novo* Proteine exprimierten, eine reduzierte mitochondriale Aktivität im Vergleich zu benachbarten untransfizierten Zellen aufwiesen, zudem war das Cytoplasma wieder verkleinert. Eine Restaktivität war jedoch in allen Zellen mit amyloiden Proteinen zu verzeichnen, wobei diese Aussage hier nicht quantifiziert wurde.

Es wurde zudem mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie festgestellt, dass es keine Colokalisationen zwischen Aggregaten der *de novo* amyloiden Proteine und ER und Golgi-Apparat gab (Colokalisation mit  $\alpha$ -Calretkulin und  $\alpha$ -GM130, Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.12 *De novo* amyloide Proteine colokalisieren nicht mit F- $\beta$ -Aktin, deformieren jedoch das $\beta$ -Aktin-Zytoskelett

Da bereits festgestellt worden war, dass die Zellen ihre ursprüngliche Morphologie verloren hatten (s. Abb. 4.12 oder 4.13), könnten Teile des Zytoskeletts in den Toxizitätsprozess involviert sein. Auch die Ergebnisse der Interaktionspartner der massenspektrometrischen Analyse (s. 8.7 Anhang G) legten eine Beteiligung des Zytoskeletts bei der Pathogenese der Zellen nahe. Da einige der identifizierten Bindungspartner ihrerseits mit  $\beta$ -Aktin interagieren können (Popowicz et al., 2006), war es unter diesem Gesichtspunkt interessant, das  $\beta$ -Aktin-

Zytoskelett der Zellen zu visualisieren. Phalloidin, ein Toxin aus Knollenblätterpilzen, bindet spezifisch an F- $\beta$ -Aktin (weniger an Monomere) und verhindert dessen Depolymerisation. An ein Fluorophor, wie z.B. Rhodamin, gebunden, kann die Struktur des  $\beta$ -Aktin Zytoskeletts in Zellen visualisiert werden. In Abb. 4.24 ist in der zweiten und dritten Reihe das F- $\beta$ -Aktin-Zytoskelett erkennbar, wobei auch einzelne Filamente dargestellt werden konnten. Es war keine Colokalisation von F- $\beta$ -Aktin mit den *de novo* amyloiden Proteinen detektierbar, weder mit den Aggregaten noch mit dem homogen über das Zytoplasma verteilten  $\alpha$ S824.



**Abb. 4.24:** *De novo* amyloide Aggregate colokalisieren nicht mit F- $\beta$ -Aktin, dessen Struktur jedoch in diesen Zellen zerstört ist. HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion fixiert, permeabilisiert, mit 1 % PBS-B blockiert und schließlich mit Phalloidin-Rhodamin, DAPI und mit  $\alpha$ -Myc-FITC-Ak gefärbt. Nach Einbettung in Mounting-Medium wurden die Präparate mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica), 63x Ölimmersionsobjektiv, analysiert.

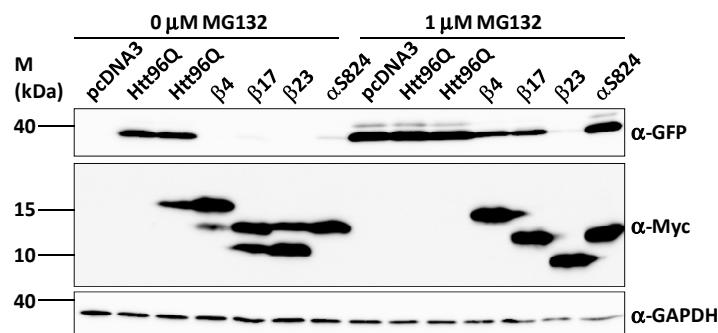
Während die Zellmorphologie und auch die F- $\beta$ -Aktin Verteilung in den  $\alpha$ S824 exprimierenden Zellen ähnlich wie die der Kontrollzellen erschien, kam es in den *de novo* amyloide Proteine exprimierenden Zellen zu einer deutlichen Veränderung des F- $\beta$ -Aktin-Zytoskeletts. Einzelne

Filamente waren nicht mehr sichtbar, es kam zu einer Kondensierung des  $\beta$ -Aktins an der Zellmembran, ebensowenig waren die F- $\beta$ -Aktin enthaltenen Filopodien zu erkennen. Insgesamt führte die Expression der *de novo* amyloiden Proteine zu einer Deformierung der Zellen und völligem Zusammenbruch des  $\beta$ -Aktin-Zytoskeletts.

#### 4.1.13 *De novo* amyloide Proteine werden nicht proteasomal degradiert und inhibieren das UPS nicht

Es stellte sich die Frage, ob die artifiziell generierten *de novo* Proteine durch das Proteasom oder durch eine spezielle Art der Autophagie (Makroautophagie im Falle der Aggregate, oder Chaperon-vermittelte Autophagie im Falle der fehlgefalteten Proteine) degradiert würden.

Insbesondere im Hinblick auf die geringeren Proteinmengen  $\beta17$  und mehr noch  $\beta23$  wurde eine der möglichen Formen der Degradation in Betracht gezogen.



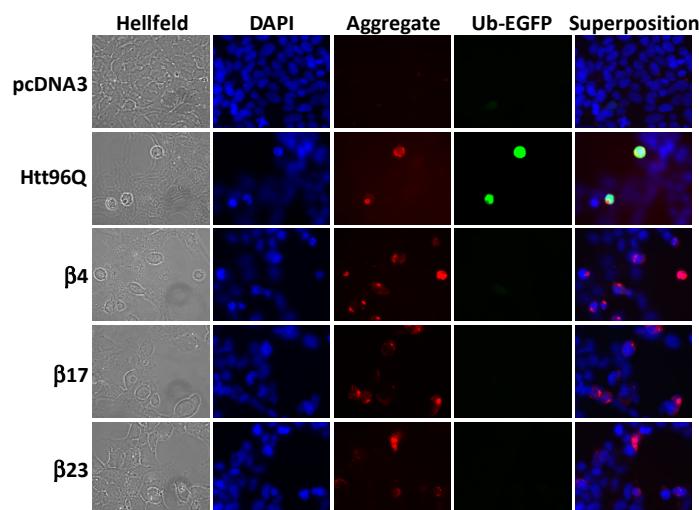
**Abb. 4.25:** *De novo* amyloide Proteine hemmen das UPS nicht und werden auch nicht via UPS degradiert.

HEK293T-Zellen wurden mit *de novo* Proteinen (Htt96Q als Positivkontrolle) und Ub-EGFP cotransfiziert, 6 h nach Transfektion mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 versetzt und nach 18 h lysiert. Der Western Blot wurde mit  $\alpha$ -GFP dekoriert, um Ub-EGFP nachzuweisen,  $\alpha$ -Myc für die *de novo*

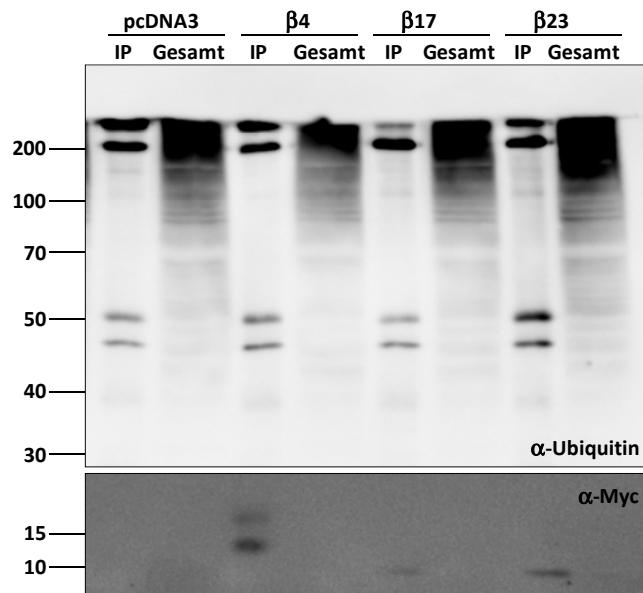
Proteine (und Htt96Q, nicht gezeigt), sowie  $\alpha$ -GAPDH gegen das Kontrollprotein.

Um eine mögliche Rolle des Proteasoms festzustellen, wurden mit *de novo* Proteinen und Ub-EGFP als Reporter cotransfizierte HEK293T-Zellen (Positivkontrolle: Htt96Q, s. auch Ergebnisse 4.3) mit oder ohne den proteasomalen Inhibitor MG132 inkubiert. Der resultierende Western Blot in Abb. 4.25 zeigt, dass nach MG132-Zugabe keine Akkumulation der *de novo* Proteine stattfand (Htt ist nicht auf dem Western Blot zu sehen, akkumulierte jedoch, s. Abschnitt Ergebnisse 4.3 über Htt96Q und Htt96Q-CL1). Das exprimierte Reporterprotein Ub-EGFP akkumulierte wie erwartet nach Zugabe des proteasomalen Inhibitors. Eine Akkumulation des Reporters war auch für die Positivkontrolle Htt96Q ohne Zugabe des Inhibitors zu erkennen. Nach Zugabe des proteasomalen Inhibitors MG132 akkumulierte Ub-EGFP in mit dem leeren Vektor transfizierten und mit Htt96Q transfizierten Zellen gleichermaßen, auch nach Cotransfektion mit  $\alpha$ S824 war die gleiche Akkumulation zu beobachten. In mit *de novo* amyloiden Proteinen cotransfizierten Zellen nahm die Menge des Reporterproteins ab, in dem Maße wie die Zytotoxizität anstieg. Diese inverse Beziehung gab einen ersten Hinweis auf eine Inhibition der Proteinbiogenese.

Immunzytochemische Analysen untermauerten den Befund, dass *de novo* amyloide Proteine nicht das UPS inhibieren. In Abb. 4.26 wird deutlich, dass auch mit dieser Methode keine Akkumulation des Reporterproteins Ub-EGFP in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine stattfand, in mit Htt96Q transfizierten Zellen jedoch eine starke Akkumulation zu verzeichnen war. Die Aggregate von Htt96Q waren auch hauptsächlich perinuklear organisiert, meistens lag pro Zelle ein großes Aggregat vor, manchmal begleitet von kleineren Satelliten, eine Morphologie, die sich von den kleineren Aggregaten der *de novo* Proteine unterschied.



analysiert, inwiefern die *de novo* amyloiden Ubiquitinierungsmuster reflexiv, aber auch anderer Proteine, verändert wird. Dazu wurde nach Inaktivierung der Deubiquitininasen eine IP gegen ubiquitiinierte Spezies durchgeführt und mit einem  $\alpha$ -Ubiquitin-Ak nachgewiesen, dass keine wesentliche Änderung des Ubiquitinierungsmusters anderer Proteine vorlag. Sowohl die Mengen als auch das Muster glichen sich (Abb. 4.27). Ebensowenig konnte eine Ubiquitinierung der *de novo* Proteine nachgewiesen werden. Weder nach Detektion mit einem  $\alpha$ -Ubiquitin-Ak fanden sich Banden der richtigen Spezies, noch nach Dekoration mit einem  $\alpha$ -Myc-Ak. Dies bedeutet, dass die *de novo* amyloiden Proteine nicht durch Ubiquitin modifiziert waren und gab einen zusätzlichen Hinweis, dass das UPS nicht in die Prozessierung der *de novo* amyloiden Proteine involviert ist.



**Abb. 4.26: *De novo* amyloide Proteine inhibieren das UPS nicht im Gegensatz zu Htt96Q.**

HEK293T-Zellen wurden mit den *de novo* amyloiden Proteinen (Htt96Q als Positivkontrolle) und Ub-EGFP cotransfiziert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Myc-Cy3, um die aggregierenden Proteine nachzuweisen, sowie mit DAPI inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss mit 63x Ölimmersionsobjektiv generiert.

In einem inversen Ansatz wurde Proteine dazu führen, dass das

Proteine dazu führen, dass das UPS nicht in die Prozessierung der *de novo* amyloiden Proteine involviert ist.

**Abb. 4.27: Eine IP mit einem  $\alpha$ -Ubiquitin-Ak zeigt kaum Unterschiede zwischen Kontrolle und *de novo* Proteinen einerseits und zwischen den *de novo* Proteinen untereinander andererseits.**

Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion in Gegenwart von NEM lysiert und das Lysat über Nacht mit einem  $\alpha$ -Ubiquitin-Ak inkubiert. SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot zeigt, dass das Ubiquitinierungsmuster nach der IP in den einzelnen Proben nicht sehr voneinander abweicht.

Eine andere Möglichkeit der Degradation wäre die Autophagie. Drei verschiedene Arten der Autophagie werden unterschieden: Mikroautophagie, Makroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (s. auch Einleitung 2.4). Um Autophagie generell zu erfassen, wurde 3-Methyladenin (3-MA) als ein Inhibitor für

Makroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (s. auch Einleitung 2.4). Um Autophagie generell zu erfassen, wurde 3-Methyladenin (3-MA) als ein Inhibitor für

Autophagie allgemein eingesetzt, um eine mögliche Akkumulation der *de novo* amyloiden Proteine zu detektieren. Bei allen drei *de novo* amyloiden Proteinen (Daten nicht gezeigt) wurde keine Akkumulation nach Zugabe von 3-MA beobachtet, anders als für Htt96Q (s. Ergebnisse Abschnitt 4.3).

Die Resultate zeigen, dass die *de novo* amyloiden Proteine nicht durch das UPS und durch Autophagie degradiert werden.

#### 4.1.14 Das *de novo* $\alpha$ -helikale Protein $\alpha$ n86 wird proteasomal degradiert

Es fiel bereits in den Western Blots (s. Abb. 4.6) und auch in immunozytochemischen Versuchen auf (Abb. 4.13), dass das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ n86 nur sehr gering exprimiert wurde. Neben einer möglichen Blockierung seiner Biogenese wäre hier auch eine vermehrte Degradation denkbar. Um die Möglichkeit des proteasomalen Abbaus zu prüfen, wurden die  $\alpha$ -helikalen Proteine nach Transfektion ebenso wie die *de novo* amyloiden Proteine mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 behandelt, um eine eventuell vermehrte Anhäufung des Proteins  $\alpha$ n86 nachzuweisen. Aus Abb. 4.28 geht hervor, dass nach Zugabe des proteasomalen Inhibitors MG132 eine Akkumulation des  $\alpha$ -helikalen Proteins  $\alpha$ n86 stattfand, die beiden anderen  $\alpha$ -helikalen Proteine  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836, sowie das hier verwendete Kontrollprotein  $\beta$ 23, nicht akkumulierten.

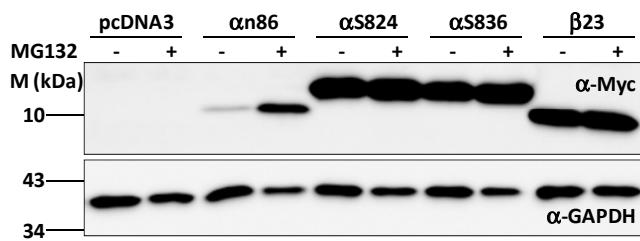


Abb. 4.28: Das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ n86 akkumuliert nach Zugabe des proteasomalen Inhibitors MG132. 6 h nach Transfektion wurde den entsprechenden Proben MG132 zugesetzt und 18 h später wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Abb. 4.28 verdeutlicht jedoch auch, dass

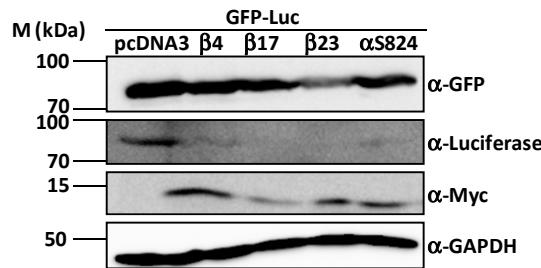
die Menge des  $\alpha$ -helikalen Proteins auch nach Zugabe von 1  $\mu$ M MG132 geringer ist als die Proteinmengen von  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836. Die Mengen des Kontrollproteins GAPDH zeigten nach Zugabe des proteasomalen Inhibitors auf Grund seiner Toxizität eine etwas geringere Menge an als bei den Kontrollspuren.

#### 4.1.15 Die Proteinbiogenese des Reporterproteins GFP-Luciferase ist in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine supprimiert

Um die Proteinfaltungskapazität der *de novo* amyloide Proteine exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurde ein Reporterprotein, GFP-Luciferase (abgekürzt GFP-Luc), welches

bereits beschrieben worden war (Chang et al., 2005), in ein Plasmid für die Expression in eukaryotischen Zellen kloniert und die drei As SKL der PES (peroxisomale Eintrittssequenz) durch die drei anderen As IAV substituiert.

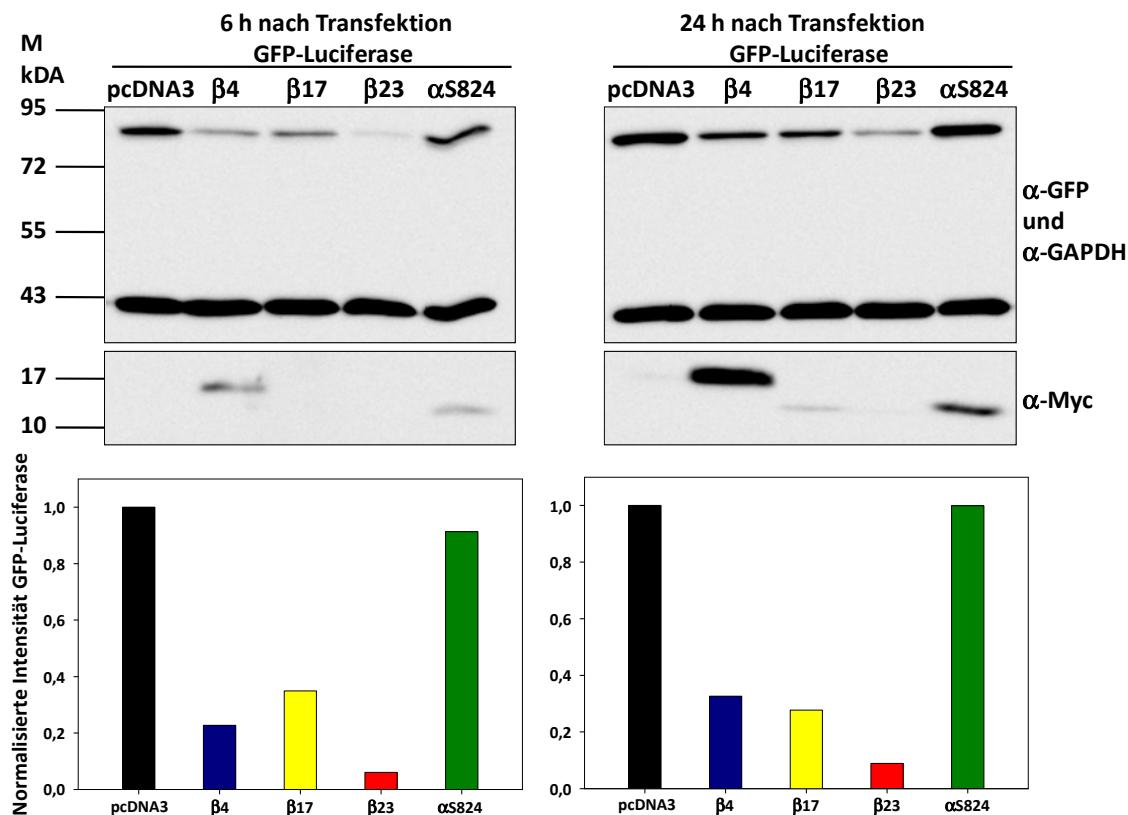
Das N-terminale GFP wurde durch einen Linker, bestehend aus 16 Aminosäuren, mit der C-terminalen Luciferase ohne PES konjugiert. Während GFP ein relativ stabiles Protein darstellt, gehört Luciferase aus *Photinus pyralis* zu den instabilen und langsam rückfaltenden Proteinen (Herbst et al., 1997).



**Abb. 4.29: GFP-Luciferase zeigt eine verminderte Expression in Gegenwart der *de novo* amyloiden Proteine.**

Nach Cotransfektion mit *de novo* Proteinen und GFP-Luc wurden die Zellen 24 h später lysiert und das Lysat via Western Blot untersucht. Die beiden verknüpften Proteine GFP und Luc wurden mit dem  $\alpha$ -GFP und  $\alpha$ -Luc-Ak auf ihre korrekte Expression untersucht. Die Molmasse lag hier wie erwartet bei etwa 90 kDa.

Zunächst wurde getestet, ob das Protein in Gegenwart der *de novo* Proteine korrekt exprimiert wurde. In Abb. 4.29 ist eine Abnahme der Expressionslevel des Reporterproteins GFP-Luc in Abhängigkeit der transfizierten *de novo* Proteine zu erkennen.

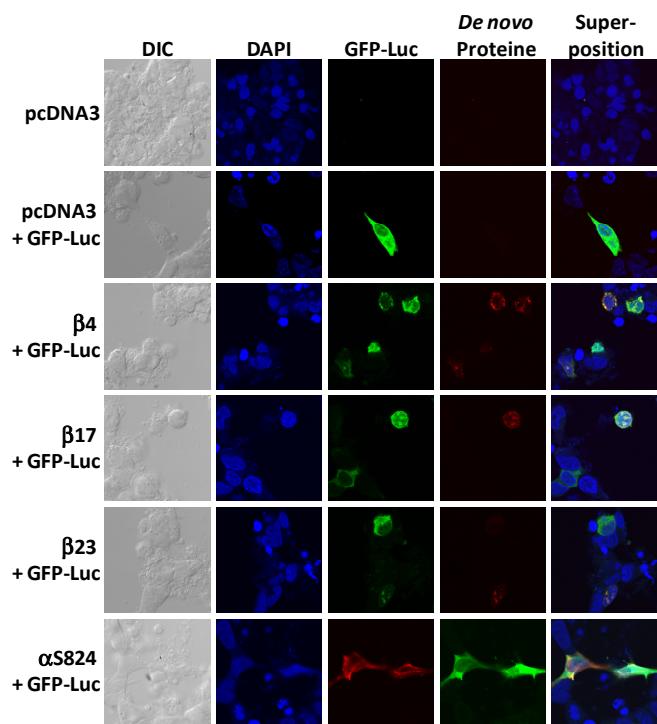


**Abb. 4.30: Verminderte Expressionslevel des Reporterproteins GFP-Luc in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine bereits 6 h nach Transfektion.** Nach Cotransfektion mit *de novo* Proteinen und GFP-Luc wurden die Zellen 6 h oder 24 h später lysiert und das Lysat mittels Western Blot untersucht. Die Intensitäten der GFP-Luc und des Kontrollproteins GAPDH wurden mit Hilfe des Programms AIDA quantifiziert und die normalisierte exprimierte Menge an GFP-Luc im Diagramm dargestellt.

Bei gleicher Beladung des Gels, angezeigt durch GAPDH als präexistentes Haushaltsprotein, zeigte die Expressionsmenge von GFP-Luc folgende Abstufung innerhalb der Proben (s. Abb. 4.30), sowohl bei einer Detektion mit  $\alpha$ -GFP als auch mit  $\alpha$ -Luc: pcDNA3  $\sim$   $\alpha$ S824  $>>$   $\beta$ 4  $>$   $\beta$ 17  $>$   $\beta$ 23. Diese Abstufung entspricht wieder der beobachteten Zytotoxizität der *de novo* Proteine. Bereits 6 h nach Transfektion war eine signifikante Verringerung des Expressionslevels des Reporterproteins im Beisein der *de novo* amyloiden Proteine zu verzeichnen. In Anwesenheit des  $\alpha$ -helikalen Proteins  $\alpha$ S824 konnte nach 24 h keine Verringerung der exprimierten Menge an GFP-Luc registriert werden. Die unterschiedlichen Ausgangsmengen an exprimierter GFP-Luc warfen jedoch die Frage auf, ob es in diesem Versuchsansatz als Reporterprotein für Fehlfaltung dienen könnte, da die Expressionslevel so unterschiedlich nach Cotransfektion mit *de novo* amyloiden Proteinen waren.

#### 4.1.16 Transient transfizierte GFP-Luc colokalisiert mit den exprimierten *de novo* amyloiden Proteinen

Einen Hinweis, dass nicht nur die Expression von GFP-Luc, sondern auch die Lokalisation anderer Proteine in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine gestört sein könnte, gab der immunzytochemische Befund der Colokalisation von GFP-Luc mit *de novo* amyloiden Aggregaten. Abb. 4.31 zeigt Zellen, die mit dem Reporterprotein GFP-Luc und *de novo* Proteinen cotransfiziert waren.



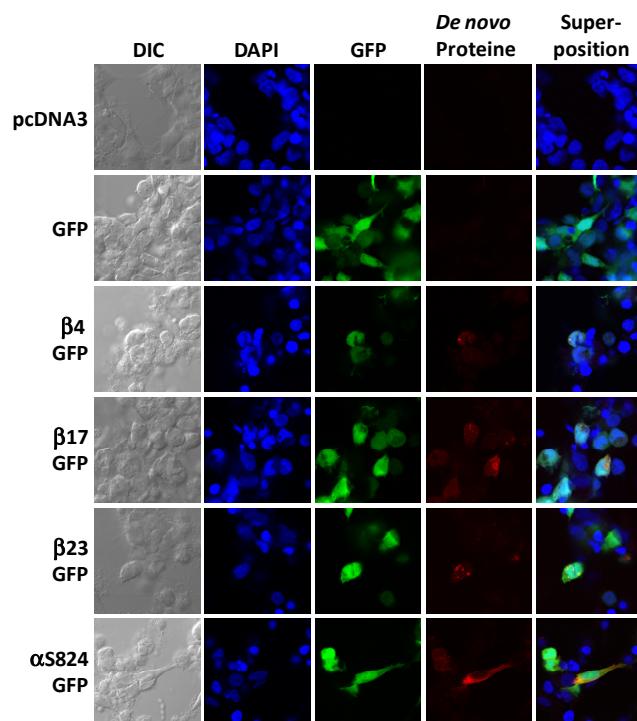
**Abb. 4.31:** Das zusammen mit *de novo* amyloiden Proteinen transient cotransfizierte Reporterprotein GFP-Luc colokalisiert mit den Aggregaten der *de novo* amyloiden Proteine.

HEK293T-Zellen wurden mit *de novo* Proteinen und dem Reporterprotein GFP-Luc cotransfiziert und anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der *de novo* Proteine mit einem  $\alpha$ -Myc-Cy3-AK und DAPI wurden die Deckgläser in Mountingmedium eingelegt und mit einem konfokalen Mikroskop mittels eines Ölimmersionsobjektivs bei 63-fachen Vergrößerung analysiert.

In diesen Fällen bildete auch das sonst lösliche Reporterprotein GFP-Luc Aggregate aus, welche exakt mit den *de novo* Proteinen colokalisierten. Bei cotransfizierten Zellen mit  $\alpha$ -helikalem

Protein und GFP-Luc waren beide homogen über die Zelle verteilt. Wurde GFP-Luc alleine überexprimiert, so lag es ebenfalls in homogen verteilter Form im Zytoplasma vor. Die Zellmorphologie schien durch Überexpression von GFP-Luc nicht beeinträchtigt zu sein, ebensowenig wie durch Coexpression mit  $\alpha$ S824. Nach Coexpression mit den *de novo* amyloiden Proteinen zeigte sich jedoch wieder eine veränderte Zellform, nämlich sphärische und verkleinerte Zellen ohne Filopodien.

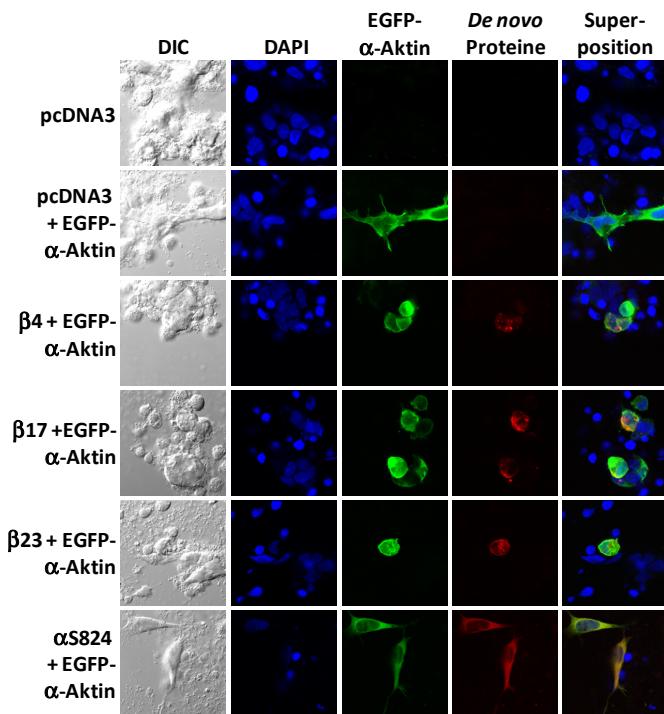
Zu Kontrollzwecken wurden Zellen auch mit GFP und *de novo* Proteinen cotransfiziert (Abb. 4.32). Hier ergab sich ein anderes Bild als mit cotransfiziertem GFP-Luc und *de novo* Proteinen (Abb. 4.31): GFP war homogen über die Zellen verteilt (ein höhere Anteil schien auch im Nukleus vorzuliegen). Bei Zellen, welche mit *de novo* amyloiden Proteinen und GFP cotransfiziert waren, wurden keine spezifischen Colokalisationen zwischen den Aggregaten der *de novo* amyloiden Proteinen und GFP dokumentiert. GFP zeigte sich weiterhin über die gesamte Zelle verteilt und aggregierte nicht. GFP eignete sich daher als ein Kontrollprotein um zu demonstrieren, dass der Luciferase-Part des GFP-Luc Fusionsproteins für die strukturelle Instabilität und die Coaggregationstendenz verantwortlich war.



**Abb. 4.32:** Das zusammen mit *de novo* amyloiden Proteinen transient cotransfizierte Protein GFP colokalisiert nicht mit den Aggregaten der *de novo* amyloiden Proteine. HEK293T-Zellen wurden mit *de novo* Proteinen und GFP cotransfiziert und anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der *de novo* Proteine mit einem  $\alpha$ -Myc-Cy3-AK und DAPI wurden die Deckgläser in Mountingmedium eingelegt und mit einem konfokalen Mikroskop mit 63x Ölimmersionsobjektiv analysiert.

Ein möglicher Kritikpunkt könnte hier sein, dass GFP allein nicht mit dem Fusionsprotein GFP-Luc vergleichbar ist und ein anderes Fusionsprotein aus GFP und einem stabileren Protein als Negativkontrolle bezüglich der

Coaggregationstendenzen in Gegenwart der *de novo* Proteine fungieren sollte. Um auch diese Möglichkeit auszuräumen, wurde ein Fusionsprotein bestehend aus  $\alpha$ -Aktin und EGFP in den Zellen zusammen mit den *de novo* amyloiden Proteine coexprimiert.



**Abb. 4.33: Das zusammen mit *de novo* amyloiden Proteinen transient cotransfizierte Fusionsprotein EGFP- $\alpha$ -Aktin colokalisiert nicht mit den Aggregaten der *de novo* amyloiden Proteine.**

HEK293T-Zellen wurden mit *de novo* Proteinen und dem Protein EGFP- $\alpha$ -Aktin cotransfiziert und anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der *de novo* Proteine mit einem  $\alpha$ -Myc-Cy3-AK und der Nuklei mit DAPI wurden die Deckgläser in Mountingmedium eingelegt und mit einem konfokalen Mikroskop mit 63x Ölimmersionsobjektiv analysiert.

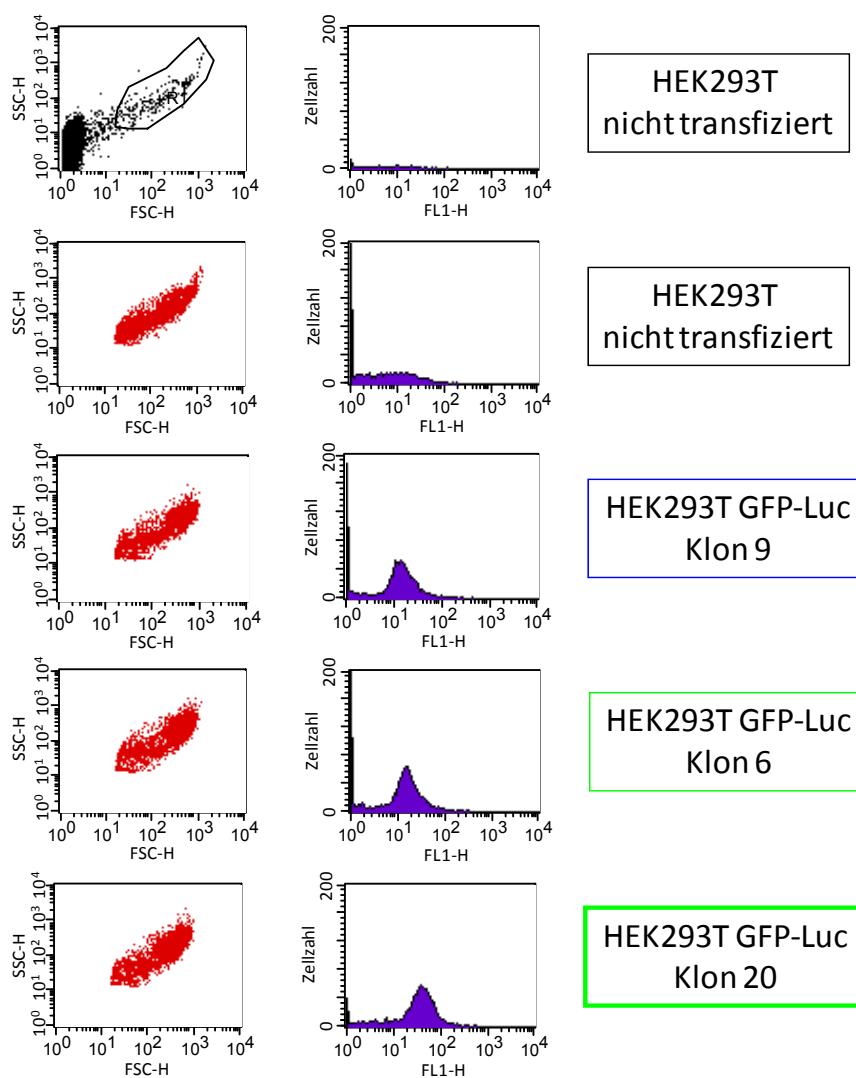
Abb. 4.33 demonstriert, dass auch das Fusionsprotein EGFP- $\alpha$ -Aktin keine Aggregationstendenzen aufwies, wenn *de novo* amyloide Proteine anwesend waren. EGFP- $\alpha$ -Aktin war homogen

über die Zelle verteilt und zeigte keine Colokalisation mit den *de novo* amyloiden Aggregaten. Da  $\alpha$ -Aktin gewählt wurde, gab es keine Interferenzen mit dem bestehenden Zytoskelett der Nicht-Muskel-Zellen. EGFP- $\alpha$ -Aktin diente so als Negativkontrolle für ein nicht coaggregierendes Fusionsprotein mit EGFP. Luciferase konnte damit als der instabile Part des Fusionsproteins GFP-Luc identifiziert werden.

Es wurden mit dem transient transfizierten Reporterprotein Rückfaltungsstudien in Anwesenheit der *de novo* Proteine durchgeführt, und es war ein Trend zu geringerer Rückfaltung der Luciferase bei  $\beta 4$ ,  $\beta 17$  und  $\beta 23$  erkennbar, jedoch waren die Unterschiede nur sehr gering (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat, zusammen mit den verringerten Expressionsmengen des Reporterproteins (s. vorheriger Abschnitt) und der Colokalisierung, führte zu der Entscheidung, eine Zelllinie zu generieren, die GFP-Luciferase stabil exprimiert.

#### 4.1.17 Generierung einer stabilen GFP-Luciferase HEK293T-Zelllinie

Aus den oben angeführten Gründen wurde eine stabile HEK293T-Zelllinie hergestellt, die GFP-Luc stabil exprimieren sollte. Dazu wurden HEK293T-Zellen, wie unter Methoden 3.2.3.8 genauer beschrieben, mit GFP-Luc transient transfiziert und die GFP-Luc exprimierenden Zellen wurden mit einem Antibiotika-haltigem Medium selektiert. Es wurden verschiedene Klone angezogen und mit Hilfe von FACS-Analysen näher charakterisiert, dabei sollte insbesondere sichergestellt werden, dass keine Mischklone entstanden.



**Abb. 4.34: Klon 20 der GFP-Luc stabil exprimierenden Zellen wurde für weitere Analysen ausgewählt.** Die GFP-Luc stabil exprimierenden Zellen wurden pelletiert, in PBS resuspendiert und einer FACS-Analyse unterzogen. Es wurde zunächst bei nicht-transfizierten Zellen eine Selektion (GATE) getroffen, dass möglichst nur intakte Zellen und keine Zelltrümmer für die Analyse ausgewertet würden (nicht transfiziert, erste Reihe). Mit dieser Selektion wurden nun nicht-transfizierte Zellen auf grüne Fluoreszenz analysiert und die verschiedenen Klone der GFP-Luc stabil exprimierenden Zellen. Der am stärksten grün fluoreszierende Klon 20 wurde mit einer fetten grünen Linie markiert.

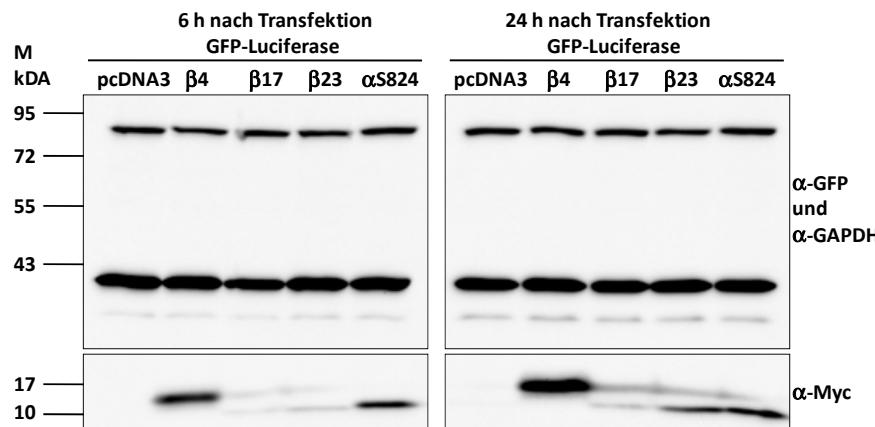
In Abb. 4.34 ist das Ergebnis der FACS-Analyse beispielhaft für

einige Klone dargestellt. Es wird deutlich, dass alle Klone der stabil mit GFP-Luc transfizierten Zellen GFP-Luc exprimierten, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Während das Peakmaximum der grünen Fluoreszenz bei den Klonen 9 und 6 nur bei 10 bzw. 20 war, lag es bei Klon 20 bei ca. 50. Diese im Durchschnitt mehr als doppelt so starke Fluoreszenz der Zellen sollte eine stärkere Expression des gewünschten GFP-Luc sicherstellen, deshalb wurde Klon 20 für die weiteren Analysen ausgewählt. Aus Abb. 4.34 geht auf Grund der unimodalen Verteilung der grünen Fluoreszenz hervor, dass keine Mischklon entstanden ist, sondern eine einheitliche Population von GFP-Luc exprimierenden Zellen erhalten wurde.

#### 4.1.18 Expressionsmengen stabil exprimierter GFP-Luc sind in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine nicht vermindert

Die Expression der *de novo* Proteine in der GFP-Luc stabil exprimierenden HEK293T-Zelllinie lieferte ein anderes Bild (s. Abb. 4.35) als die mit GFP-Luc und *de novo* Proteinen transient cotransfizierten Zellen (s. Abb. 4.30). Die exprimierten GFP-Luc Mengen änderten

sich in der stabilen Zelllinie nicht, wenn amyloide *de novo* Proteine coexprimiert wurden. Somit war das Teilziel, eine einheitliche Reportermenge in den Zellen exprimiert zu haben, auch in Anwesenheit der *de novo* Proteine, erreicht, und Rückfaltungsversuche konnten durchgeführt werden.

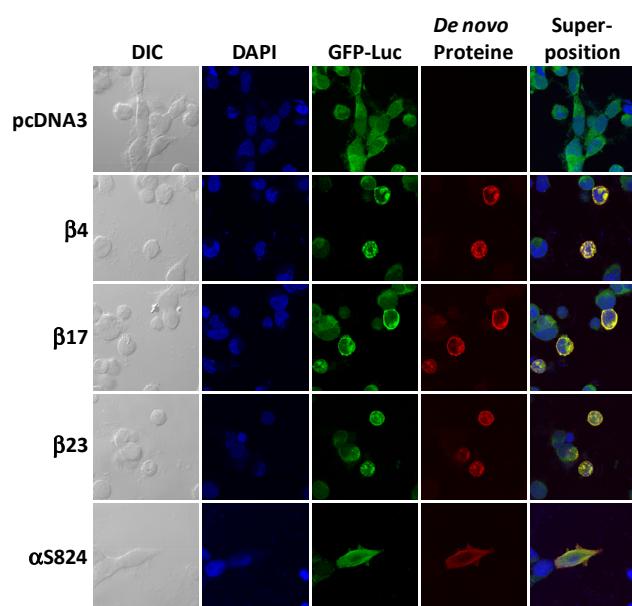


**Abb. 4.35:** Die stabile Zelllinie GFP-Luc-HEK-293T zeigt keine Verminderung der exprimierten GFP-Luc nach Transfektion mit *de novo* amyloiden Proteinen. Klon 20 der stabilen Zelllinie wurde transient mit den *de novo* Proteinen transfiziert und 6 h oder 24 h nach Transfektion lysiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurden keine Unterschiede der GFP-Luc-Mengen detektiert.

Ein Effekt auf die Proteinbiogenese des stabil exprimierten Konstrukts durch die *de novo* amyloiden Proteine war mittels Western Blot nicht nachweisbar.

#### 4.1.19 Stabil exprimierte GFP-Luc colokalisiert mit den exprimierten *de novo* amyloiden Proteinen

Die transient in der stabilen GFP-Luc-Zelllinie exprimierten *de novo* amyloiden Proteine colokalisierten ebenfalls mit GFP-Luc.



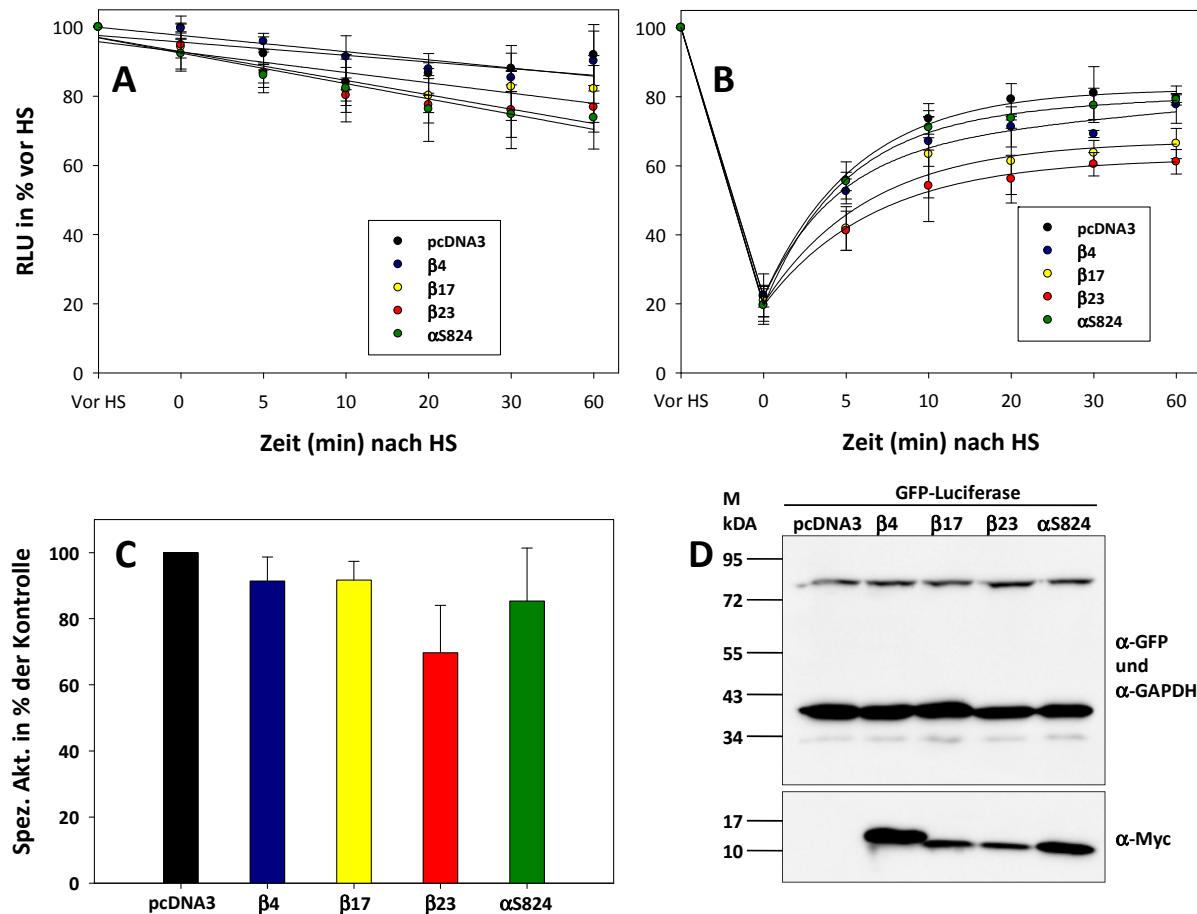
**Abb. 4.36:** Das zusammen mit *de novo* amyloiden Proteinen stabil exprimierte Reporterprotein GFP-Luc colokalisiert mit den Aggregaten der *de novo* amyloiden Proteine. HEK293T-Zellen, welche das Reporterprotein GFP-Luc stabil exprimierten, wurden mit *de novo* Proteinen transfiziert und anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der *de novo* Proteine mit einem α-Myc-Cy3-AK und DAPI wurden die Deckgläser in Mountingmedium eingelegt und mit einem konfokalen Mikroskop und einem 63x Ölimmersionsobjektiv analysiert.

Zunächst fällt bei Abb. 4.36 im Vergleich zu Abb. 4.31 auf, dass alle Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigten, was bei der

stabilen Zelllinie zu erwarten war. Die meisten Zellen der Zelllinie besaßen, sofern nicht mit amyloiden Proteine transfiziert, eine normale Zellmorphologie. Waren sie mit *de novo* Proteinen transfiziert, verkleinerten sie sich und verloren ihre Filopodien. Wieder zeigte sich eine starke Colokalisation der Aggregate der *de novo* Proteine und GFP-Luc. In nicht mit *de novo* Proteinen transfizierten Kontrollzellen fand diese Aggregatbildung von GFP-Luc nicht statt. In Zellen mit exprimiertem  $\alpha$ S824 war GFP-Luc wieder homogen über das Zytoplasma verteilt.

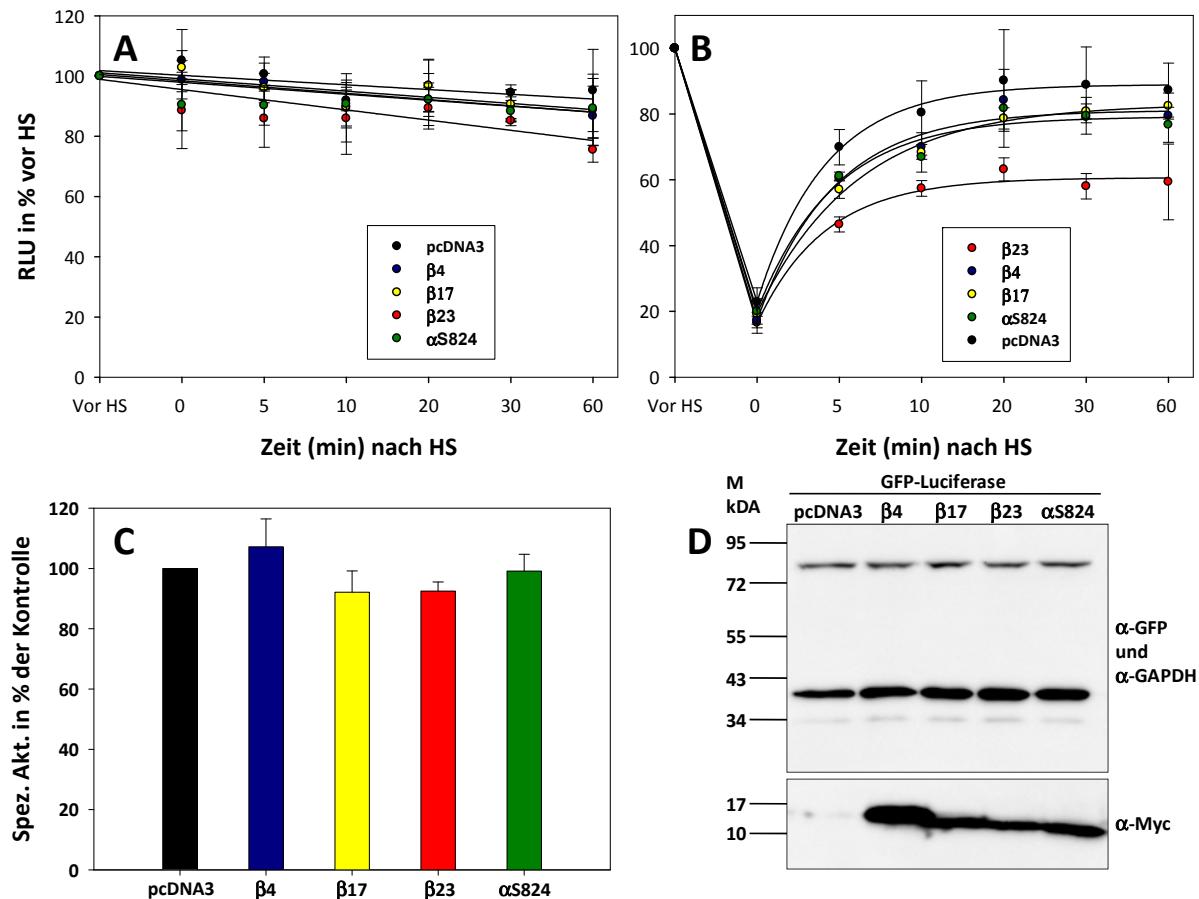
#### **4.1.20 Die Rückfaltung der stabil exprimierten GFP-Luc wird durch die Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine inhibiert**

Wie bereits beschrieben, deutete sich eine Hemmung der Rückfaltung des transient transfizierten GFP-Luc in Gegenwart der *de novo* amyloiden Proteine an. Jedoch war nur ein Trend erkennbar, wahrscheinlich waren nicht genügend Zellen cotransfiziert. Daher wurde die stabile Zelllinie generiert, um sicherzustellen, dass alle Zellen, welche mit *de novo* Proteinen transient transfiziert waren, GFP-Luc exprimierten. Abb. 4.37 zeigt Rückfaltungsexperimente 6 h nach Transfektion. Bereits nach dieser Zeit deutete sich eine verminderte Rückfaltung der GFP-Luc in Gegenwart der *de novo* amyloiden Proteine, insbesondere  $\beta$ 23, an. Ein leichter Rückgang der Luciferase-Aktivität ist zu verzeichnen, was die Teilabbildung A, wo die GFP-Luc stabil exprimierenden Zellen bei konstant 37 °C gehalten wurden, verdeutlicht. In Teilabbildung B ist die Rückfaltung nach HS bei 42 °C dargestellt. Die Rückfaltung der Kontrolle (GFP-Luc der stabilen Zelllinie, nur mit pcDNA3 transfiziert) fand nach 60 min. zu ca. 80 % statt, die Rückfaltung der mit  $\beta$ 23 transfizierten Probe nach 60 min. nur zu ca. 60 %. Länger als 60 min. zu warten war aufgrund des Befundes aus Teilabbildung A, wo die Aktivität der GFP-Luc kontinuierlich abnahm, nicht sinnvoll. Auch schien nach ca. 30 min. die Plateauphase der Rückfaltung erreicht zu sein. Die spezifischen Aktivitäten vor dem HS, dargestellt in Teilabbildung C, unterschieden sich kaum voneinander, nur  $\beta$ 23 fiel etwas geringer aus. Die spezifische Aktivität wurde ermittelt, indem zuerst aus dem Western Blot in Teilabbildung 4.37 D die gegen GAPDH normalisierte GFP-Luc Menge mit Hilfe des Programms AIDA bestimmt wurde. Die Aktivitäten vor dem HS wurden dann durch die normalisierte GFP-Luc-Menge dividiert.



**Abb. 4.37: Die Rückfaltung des Reporterproteins GFP-Luc ist bereits 6 h nach Transfektion in Gegenwart der *de novo* amyloiden Proteine verringert.** Die stabile GFP-Luc Zelllinie wurde mit den *de novo* Proteinen transfiziert und 6 h später wurde die Translation mit Cycloheximid gestoppt. Die Zellsuspension wurde *in vivo* einem zeitabhängigen Luciferasetest unterzogen. Ein Teil der Proben wurde konstant bei 37 °C gehalten, der andere Teil wurde einem HS für 10 min. ausgesetzt und wieder bei 37 °C inkubiert. Vor dem HS wurde ein anderes Aliquot der Proben lysiert, um mit Hilfe eines Western Blots die spezifische Aktivität vor dem HS zu ermitteln.

Wurde die Rückfaltungsanalyse 24 h nach Transfektion durchgeführt, kristallisierte sich eine stärkere Hemmung der Rückfaltung des GFP-Luc in Anwesenheit des Proteins β23 heraus (s. Abb. 4.38). Während die Rückfaltung der mit leerem Plasmid transfizierten Kontrolle bei ca. 90 % des Ausgangswertes 60 min. nach HS lag, kehrte die Aktivität der GFP-Luc in der Probe mit Protein β23 nur zu ca. 60 % zurück. Die Aktivitäten der GFP-Luc in Anwesenheit der *de novo* Proteine β4 und β17 kehrten auf ca. 80 % bzw. 75 % der Ausgangsaktivität zurück. Da die Plateauphase bereits nach spätestens 30 min. nach HS erreicht war und die Aktivität der kontinuierlich bei 37 °C gehaltenen Zellen abnahm, wurden Werte nur bis 60 min. nach dem HS gemessen. Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen mit *de novo* Proteinen transfizierten Proben unterschieden sich vor Beginn des HS nicht signifikant voneinander.

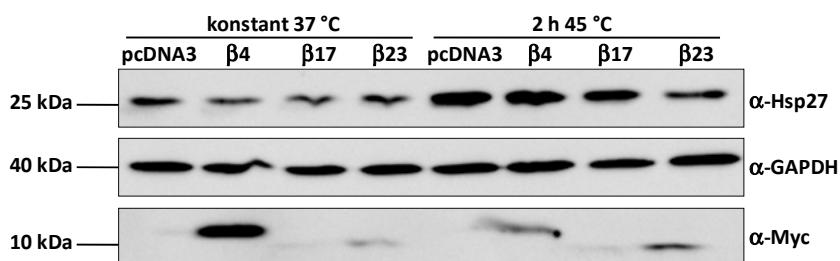


**Abb. 4.38: Die Rückfaltung des Reporterproteins GFP-Luc ist 24 h nach Transfektion in Gegenwart des *de novo* amyloiden Proteins  $\beta$ 23 und partiell  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 verringert.** Die stabile GFP-Luc Zelllinie wurde mit den *de novo* Proteinen transfiziert und 24 h später wurde die Translation mit Cycloheximid gestoppt. Die Zellsuspension wurde *in vivo* einem zeitabhängigen Luciferasetest unterzogen. Ein Teil der Proben wurde konstant bei 37 °C gehalten, der andere Teil wurde einem HS für 10 min. ausgesetzt und wieder bei 37 °C inkubiert. Vor dem HS wurde ein anderes Aliquot der Proben lysiert, um mit Hilfe eines Western Blots die spezifische Aktivität vor dem HS zu ermitteln.

Die *de novo* amyloiden Proteine sind somit in der Lage, die Rückfaltung labiler Proteine, sei es direkt oder indirekt, zu inhibieren.

#### 4.1.21 *De novo* amyloide Proteine supprimieren die Hitzeschockantwort (HSR)

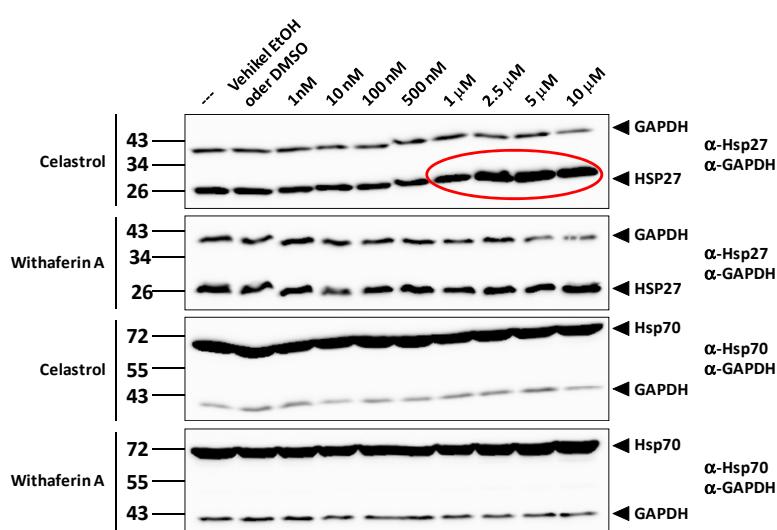
Es wurde bereits unter mehreren Bedingungen beobachtet, dass die Präsenz der *de novo* amyloiden Proteine die Biogenese anderer Proteine unterdrückt. Da die *de novo* Proteine nicht auf das UPS einwirken (s. Abschnitt 4.1.13), war es naheliegend, den Grund in einer verminderten Transkription oder Translation zu suchen. Eine Möglichkeit der starken Toxizität, insbesondere von  $\beta$ 23, könnte eine Suppression der HSR sein. Um dies zu überprüfen, wurde ein Aliquot von HEK293T-Zellen, welche zuvor mit *de novo* Proteinen transfiziert worden waren, einem Hitzeschock ausgesetzt, das andere Aliquot jeweils konstant bei 37 °C gehalten.



**Abb. 4.39:** Die Überexpression von Hsp27 ist durch Anwesenheit von *de novo* amyloiden Proteinen supprimiert.  
HEK293T-Zellen wurden transfiziert und 20 h später einem zweistündigen HS ausgesetzt, wohingegen ein anderes Aliquot jeweils bei konstant 37 °C gehalten wurde.

Verschiedene Chaperone, wie z.B. Hsp70, Hsp90 oder Hsp27 wurden per Western Blot daraufhin überprüft, inwieweit sie durch den Hitzeschock induziert wurden. Da Hsp70 in den HEK293T-Zellen als transformierte Zelllinie bereits stark überexprimiert war, und mit Hsp90 auch keine Induktion unter verschiedenen Bedingungen beobachtet werden konnte, wurde Hsp27 als ein Indikator für eine funktionende HSR in diesem Zelltyp herangezogen. Hsp27 wurde, wie in Abb. 4.39 gezeigt, nach einem zweistündigen HS stärker in den Kontrollzellen, aber auch in geringerem Maße bei β4 und β17, exprimiert. In Anwesenheit von β23 wurde jedoch keine Induktion der Expression erreicht, so dass die Menge an gebildetem Hsp27 der Ausgangsmenge ohne HS entspricht. Wieder trat hier eine – diesmal inverse – Korrelation zur Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine auf, wobei die Suppression des HS folgendermaßen in Gegenwart der *de novo* Proteine zunahm: β4 < β17 < β23.

Da der lange Hitzeschock die Zellen sehr in Mitleidenschaft zog, wurden andere Methoden gesucht, um die HSR auszulösen. Von Celastrol und Withaferin A war bekannt, dass sie eine HSR auslösen können und die Expression einiger Hsps induzieren (Mu et al., 2008). Deshalb wurde für die HEK293T-Zellen sowohl eine konzentrationsabhängige als auch eine zeitliche Titration der Induktoren durchgeführt.

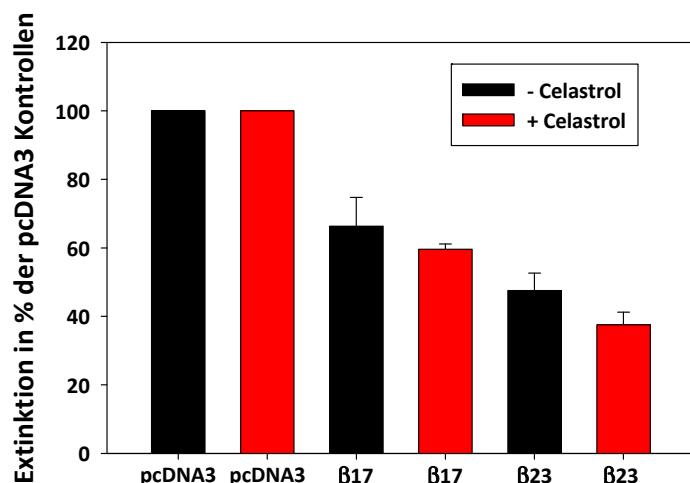


**Abb. 4.40:** Hsp27 wird durch Konzentrationen von > 1 μM Celastrol in HEK293T-Zellen induziert, jedoch nur wenig durch Withaferin A.  
HEK293T-Zellen wurden ausgesät und einen Tag später mit den entsprechenden Konzentrationen beider Substanzen für 24 h inkubiert. Der rot markierte Bereich zeigt eine Induktion der Hsp27-Expression durch Celastrol.

Die minimale Celastrol-Konzentration, die eine HSR induziert, und damit auch die vermehrte Expression von Hsp27, wurde zu 1 μM ermittelt, mit

5  $\mu\text{M}$  war eine Sättigung erreicht. Hsp70 konnte wieder nicht induziert werden, mit Withaferin A war nur ab 5  $\mu\text{M}$  eine leichte Induktion des Hsp27 registrierbar (s. Abb. 4.40).

Bereits 6 h nach Zugabe der Induktoren war die HSR mit Celastrol beobachtbar, 18 h später auch mit Withaferin A. Wieder zeigte Celastrol die stärkere Induktion bei Hsp27, so dass Celastrol in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Es wäre zu erwarten gewesen, dass eine Induktion der Hsps eine niedrigere Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine bedingt. Da jedoch eine Induktion der Hsps durch die Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine unterdrückt wurde, musste die Induktion vor der Transfektion durchgeführt werden. Es trat jedoch keine Verbesserung des Zellzustandes ein, die Toxizität wurde im Gegenteil durch das Celastrol noch verstärkt.



**Abb. 4.41:** Die Zytotoxizität der amyloiden Proteine nimmt nach Celastrolvorbehandlung nicht ab.  
HEK293T-Zellen wurden mit 2,5  $\mu\text{M}$  Celastrol vorbehandelt und 24 h später per Elektroporation mit den amyloiden Proteinen  $\beta 17$  und  $\beta 23$  transfiziert. Drei Tage später wurde der MTT-test durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte jeweils auf die beiden Kontrollen, - Celastrol und + Celastrol.

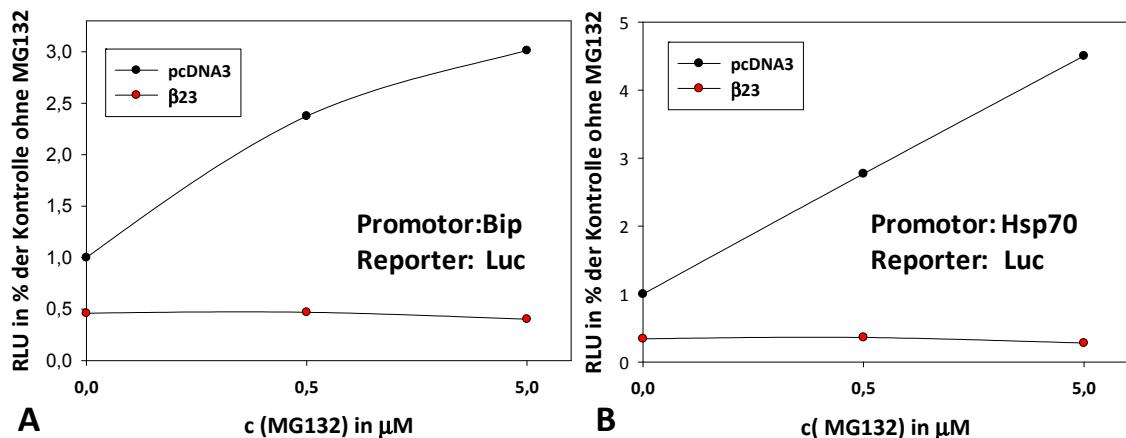
Erst die später angewandte Strategie, Hsp110 (wurde massenspektrometrisch als Interaktionspartner der *de novo* Proteine identifiziert) gezielt überzuexprimieren und dann die *de novo* Proteine zu transfizieren, führte zu einer Verminderung der Toxizität (s. Abb. 4.64).

Nicht nur die vermehrte Expression endogener Hsps war durch die *de novo* amyloiden Proteine inhibiert, auch die HSR bzw. die UPR, detektiert durch exogen eingebrachtes Reporterprotein Luciferase unter der Kontrolle eines Hsp70- bzw. Bip-Promotors, zeigten eine signifikante Inhibition durch die *de novo* amyloiden Proteine.

Die Induktion des Reporterproteins Luciferase unter der Kontrolle der Promotoren Bip oder Hsp70 wurde mit Hilfe von MG132 erreicht. MG132 ist nicht nur ein reversibler proteasomaler Inhibitor, sondern wie bereits in früheren Publikationen gezeigt (Mu et al., 2008), in der Lage, die HSR und die UPR zu induzieren. Aus beiden Teilabbildungen 4.42 A und B geht hervor, dass MG132 eine starke Induktion der HSR und UPR in Zellen auslösen konnte, welche nur mit einem leeren Plasmid transfiziert waren. Unter Kontrolle des Bip-Promotors erreichte diese Induktion ca. das dreifache des Ausgangswertes, unter Hsp70-

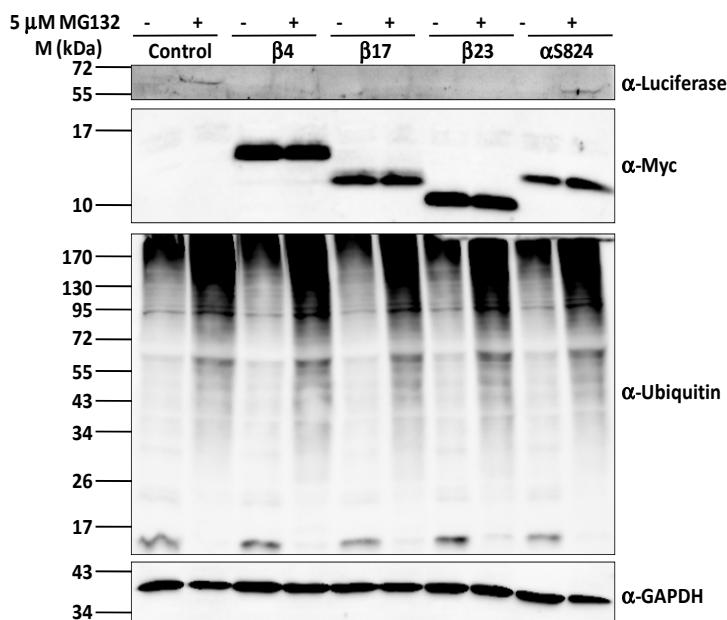
Promotor sogar das 4,5-fache. Wenn jedoch das toxische Protein  $\beta23$  exprimiert wurde, fand keine Induktion statt und das Ausgangslevel der Luciferase-Aktivität war in beiden Experimenten ca. um die Hälfte geringer als nur mit leerem Vektor transfizierten Zellen.

Das Experiment, bei welchem Luciferase unter der Kontrolle des Hsp70-Promotors transfiziert worden war, wurde in Anwesenheit der anderen *de novo* Proteine mehrmals wiederholt.



**Abb. 4.42:** Die Luciferase-Aktivität unter Kontrolle des Bip- oder Hsp70-Promotors ist vollständig supprimiert in Gegenwart des *de novo* Proteins  $\beta23$ . HEK293T-Zellen wurden mit dem Reporterprotein Luc unter der Kontrolle der Promotoren von Bip (A) oder Hsp70 (B) und dem *de novo* Protein  $\beta23$  cotransfiziert. 6 h später wurden die angegebenen Mengen MG132 hinzugefügt und die Luciferase-Aktivität 24 h nach Transfektion gemessen.

Luciferase wurde zum einen nur exprimiert, wenn auch eine Induktion mit MG132 stattfand (Abb. 4.43) und wenn das Kontrollplasmid pcDNA3 oder  $\alpha$ S824 cotransfiziert worden war.

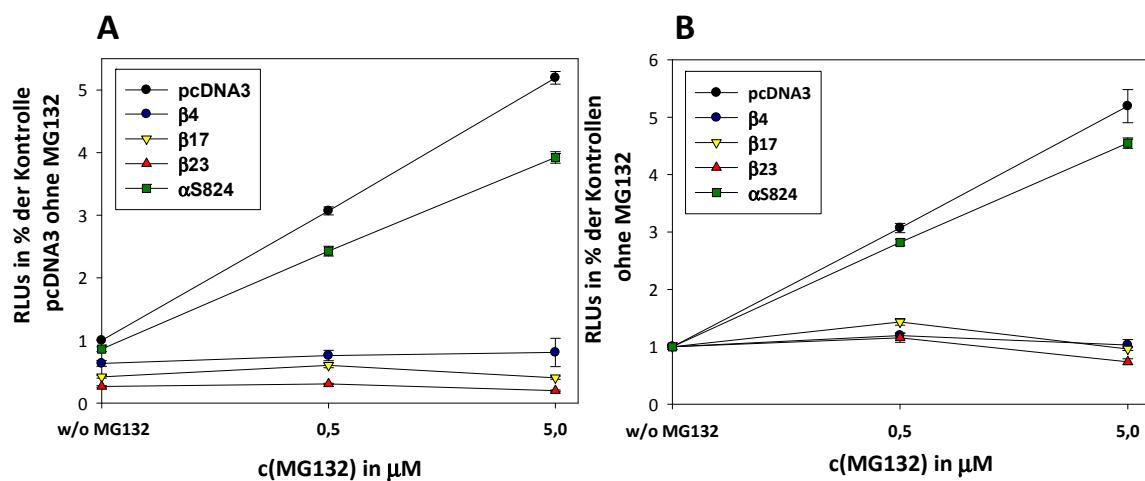


**Abb. 4.43:** Luciferase unter Hsp70-Promotor ist nach Induktion mit MG132 nur in der Kontrolle (pcDNA3) und in Anwesenheit von  $\alpha$ S824 detektierbar.

HEK293T-Zellen wurden mit *de novo* Proteinen und Plasmid codierend für Luciferase unter der Kontrolle des Hsp70-Promotors transfiziert, nach 6 h wurden verschiedene Konzentrationen MG132 zugefügt (im Western Blot nur 5  $\mu\text{M}$  gezeigt), 24 h später erfolgte die Lyse der Zellen, mittels Western Blot wurden die Luciferasemengen detektiert sowie die ubiquitinierten Spezies nach Zugabe von MG132 durch  $\alpha$ -Ubiquitin-Ak.

Waren die *de novo* amyloiden Proteine coexprimiert, konnte keine Expression von Luciferase im Western Blot nachgewiesen werden. Dass MG132 bei allen Transfektionen in gleicher Weise angewendet wurde, zeigt der mit  $\alpha$ -Ubiquitin-Ak dekorierte Western Blot.

Ein Anstieg der ubiquitinierten Spezies war bei allen mit MG132 behandelten Proben in gleichen Mengen beobachtbar. Der  $\alpha$ -GAPDH-Blot zeigt, dass 5  $\mu$ M MG132 bereits eine leichte Zytotoxizität bedingte, da die GAPDH-Mengen bei den mit MG132 behandelten Proben etwas geringer ausfielen. Die Messung der Luciferase-Aktivität vervollständigte das Bild: Hier wurde wieder eine starke Suppression in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine registriert.



**Abb. 4.44: Die Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine inhibiert die Luciferase-Aktivität unter Kontrolle des Hsp70-Promotors vollkommen.** HEK293T-Zellen wurden mit dem Reporterprotein und den *de novo* Proteinen cotransfiziert und 6 h später mit 0,5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M MG132 inkubiert, 24 h nach Transfektion wurde lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. In Teilabbildung A wurden alle Werte auf die Kontrollprobe (pcDNA3) ohne MG132-Behandlung normalisiert. In Teilabbildung B wurden die Werte jeder Probe auf die zugehörigen Werte ohne MG132 jeder Transfektion normalisiert.

Abb. 4.44 demonstriert wieder die Fähigkeit der *de novo* amyloiden Proteine die Luciferase 100 %ig zu inhibieren. In Teilabbildung A war in Kontrollzellen ein Anstieg der Luciferase-Aktivität auf das fünffache des Ausgangswertes ohne MG132-Induktion zu verzeichnen, in Gegenwart des  $\alpha$ -helikalen *de novo* Proteins immerhin noch auf das vierfache. In Gegenwart der *de novo* Proteine  $\beta_4$ ,  $\beta_{17}$  und  $\beta_{23}$  wurde kein Anstieg der Luciferase-Aktivität registriert. Auch hier war die Basalaktivität der Luciferase bereits ohne Induktion gestaffelt: Kontrolle >  $\alpha$ S824 >>  $\beta_4$  >  $\beta_{17}$  >  $\beta_{23}$ . Wurden alle Werte der gleichen Probe auf die Aktivität dieser Probe ohne MG132 bezogen (Teilabbildung B), so ergab sich ein noch deutlicheres Bild der Hemmung der Luciferase unter Kontrolle des Promotors von Hsp70: Die Luciferase Aktivität lag bei der Kontrolle nach Induktion mit 5  $\mu$ M MG132 beim fünffachen des Wertes ohne MG132-Zugabe, für  $\alpha$ S824 beim 4,5-fachen. Bei den *de novo* Proteinen  $\beta_4$ ,  $\beta_{17}$  und  $\beta_{23}$  war

sogar eine Abnahme der Aktivität unter den Ausgangswert zu verzeichnen, wenn mit 5 µM MG132 induziert worden war.

Zusammenfassend supprimieren die *de novo* amyloiden Proteine die HSR und verhindern so eine adäquate Adaption an eine veränderte Proteostase.

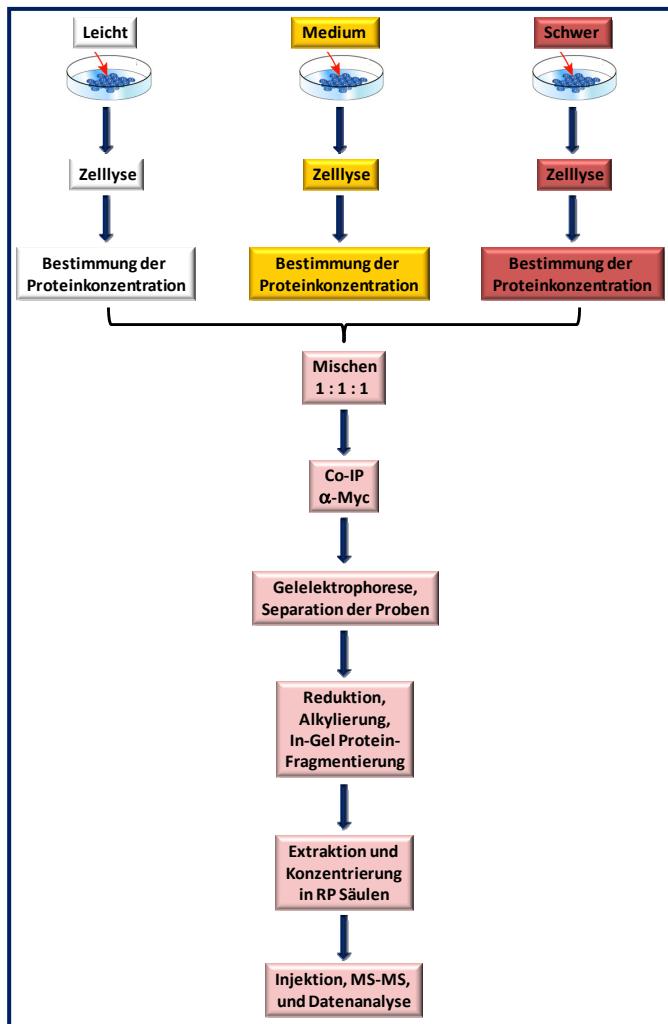
#### 4.1.22 SILAC in Kombination mit Co-IP und anschliessender Massenspektrometrie

Nachdem die Befunde zur Zytotoxizität, Apoptose, der veränderten Zellmorphologie und des supprimierten HSR vorlagen, stellte sich die Frage, welche Proteine mit den *de novo* Proteinen interagieren könnten, zumal keine Colokalisation mit zellulären Kompartimenten (außer dem Nukleus) nachgewiesen werden konnte. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Strategie der Immunpräzipitation von Interaktionspartnern und anschließender Detektion mit Hilfe der Massenspektrometrie gewählt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass Proteine unter nativen Bedingungen in Umgebung der Zytoplasmabestandteile (anders als z.B. Yeast-two-Hybrid-Screen) analysiert werden können und Verhältnisse der angereicherten Proteine bestimmt werden können.

Einerseits sollten die spezifischen Interaktionspartner von β23 im Vergleich zur Kontrolle (nur mit dem leeren Vektor pcDNA3 transfiziert) und zum α-helikalen Kontrollprotein, andererseits die Unterschiede der Interaktionspartner der drei *de novo* amyloiden originalen Proteine β4, β17 und β23 untereinander bestimmt werden. Zunächst wurde in Vorversuchen die IP optimiert, sowie Pufferbedingungen der Lyse (Desoxycholat, Chaps, Triton X-100) und Zentrifugationszeiten getestet. Die Entscheidung fiel auf die Anwendung des Detergents Triton X-100, da hier das meiste Protein nicht im Zelldebris, sondern im Überstand nach Zentrifugation bei 2000 g vorlag (Daten nicht gezeigt). Auch die Ultrazentrifugation und Slot Blot zeigten, dass Aggregate in PBS mit 1 % Triton und Protease-Inhibitor nicht zerfallen waren.

Zweimal wurde eine Co-IP von drei Proben durchgeführt: Transfiziert mit leerem Vektor, transfiziert mit αS824 und transfiziert mit β23. Präzipitiert wurde zunächst mit einem an Proteinsepharose A gebundenen α-Myc-Ak. Anschließend wurden die Proben wie in Material und Methoden beschrieben gereinigt und zur MS gegeben (Dr. Sonya Schermann). Es wurden viele Interaktionspartner, insbesondere von Protein β23 gefunden, jedoch schwankten die Ergebnisse der beiden Versuche. Deshalb wurde entschieden, die Prozedur der IP und anschließenden Aufreinigung weniger fehleranfällig von außen zu gestalten und die Versuche in Kombination mit SILAC durchzuführen. SILAC steht für „Stable isotope

labeling by amino acids in cell culture“ (Ong et al., 2002), dabei werden die Zellen mit unterschiedlich schweren, nicht-radioaktiven Isotopen in bestimmten essentiellen Aminosäuren markiert. Sie werden solange in Medium gehalten, bis eine nahezu vollständige Inkorporation der isotopenmarkierten Aminosäuren in das Proteom erfolgt ist.



**Abb. 4.45:** Überblick über die experimentelle Prozedur des SILAC, Co-IP, Aufarbeitung und Fragmentierung der Proteine in Peptide sowie anschließende MS.

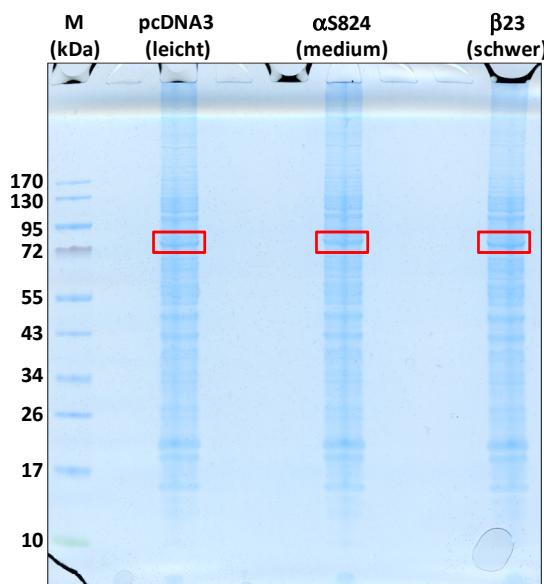
Die Zellen wurden mit leichten, mittleren oder schweren Aminosäuren markiert (s. Methoden) und mit den entsprechenden Vektoren transfiziert (für ein Versuchset entweder mit pcDNA3 = leicht;  $\alpha$ S824 = mittel;  $\beta$ 23 = schwer; oder  $\beta$ 4 = leicht;  $\beta$ 17 = mittel;  $\beta$ 23 = schwer). Anschließend wurden die Zellen lysiert und von jeder Probe die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden dann im Verhältnis 1:1:1 gemischt und die Co-IP mit einem  $\alpha$ -Myc-Ak durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine geelektrophoretisch getrennt und sektioniert, sowie die Reduktion mit DTT, eine Alkylierung und Fragmentierung mit Trypsin durchgeführt. Es folgte die Extrahierung der resultierenden Peptide aus dem Gel, ihre Konzentrierung in RP-Säulen, die Injektion und MS sowie die spätere Datenanalyse (s. auch Methoden 3.2.2.14 und 3.2.2.15).

Die Inkorporation der markierten Aminosäuren wurde ebenfalls mittels MS überprüft. Die Adaptierungsphase und Transfektion der HEK293T-Zellen (Dr. R. Martin Vabulas) wurde 24 h vor

Zellyse und IP wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Abb. 4.45 zeigt ein Fließschema der Experimente. Die SILAC-Methode hat den Vorteil, dass die individuellen und zufälligen Fehler während der IP, der Aufreinigung und Extraktionsschritte minimiert werden, da alle drei Proben jedes Sets genau identisch behandelt werden, weil sie sich in dem gleichen Reaktionsgefäß befinden.

Ein Nachteil ist der höhere Arbeitsaufwand in der Adoptionsphase und damit verbunden auch der höhere Kostenaufwand für die mit unterschiedlichen Isotopen markierten Aminosäuren. Es ist zwar, wie schon erwähnt, keine quantitative Bestimmung der angereicherten Proteine möglich, aber die Mengenverhältnisse zwischen den einzelnen Proben können auf diese Weise bestimmt werden. Jedes Versuchset (A: pcDNA3,  $\alpha$ S824,

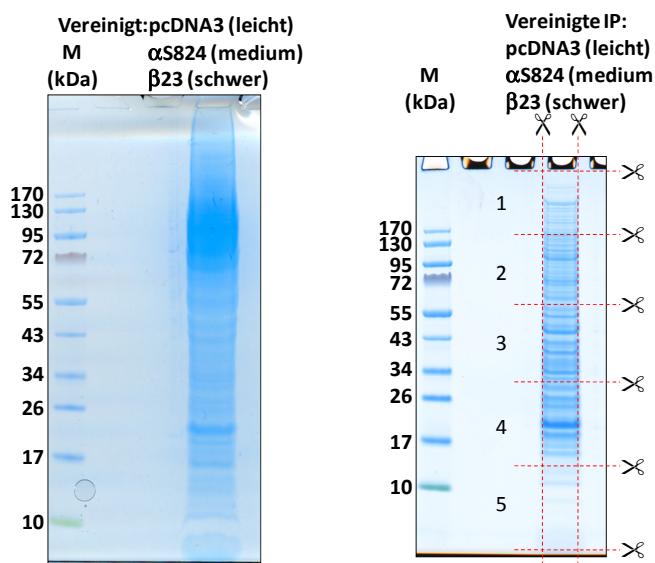
$\beta 23$ ; B:  $\beta 4$ ,  $\beta 17$ ,  $\beta 23$ ) wurde dreimal als unabhängiges Experiment von der Transfektion (40 Millionen Zellen pro Probe) bis zur Identifizierung der Interaktionspartner durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen waren zwischen den einzelnen Proben sehr ähnlich (s. Abb. 4.46, für das Set  $\beta 4$ ,  $\beta 17$ ,  $\beta 23$  nicht gezeigt) und die Proben wurden im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Auch die Inkorporation der markierten Aminosäuren in das Proteom war mit über 89 % zufriedenstellend hoch. Die IP bzw. Co-IP wurde dann mit Hilfe von magnetischen Kugelchen, an welche  $\alpha$ -Myc-Abs gebunden waren, durchgeführt, wobei die drei Proben eines jeden Sets für diesen Schritt bereits vereinigt waren.



**Abb. 4.46:** Gleiche Mengen Proteinlysate mit verschiedenen markiert und transfiziert vor der Vereinigung 1 : 1 : 1.

24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration wurde bestimmt. Hier auf diesem Bild wurden gleiche Volumina des Lysats auf ein Gel geladen, um zu visualisieren, dass in etwa gleiche Proteinmengen (Schwankungen von ca. 3 %) in jeder Probe vorlagen. Von diesen Proben wurde ein Aliquot zurückbehalten, um durch die MS zu belegen, dass eine vollständige Inkorporation der markierten Aminosäuren in das Proteom stattgefunden hatte. Dazu wurde aus dem Gel für jede Probe eine prominente Bande ausgeschnitten (Hsp70, Hsc70 enthaltend, rote Quadrate) und mittels MS analysiert.

Aus Abb. 4.47 geht hervor, dass die Vereinigung der Lysate pcDNA3 (leicht),  $\alpha$ S824 (mittel) und  $\beta$ 23 (schwer) eine diffuse Spur mit Proteinen ergab, in welchen fast keine spezifischen Banden zu erkennen waren. Nach der IP der drei Proben waren jedoch distinkte Banden nach Färbung mit kolloidalem Blau zu erkennen, gleichbedeutend mit einer Anreicherung spezifischer Proteine.

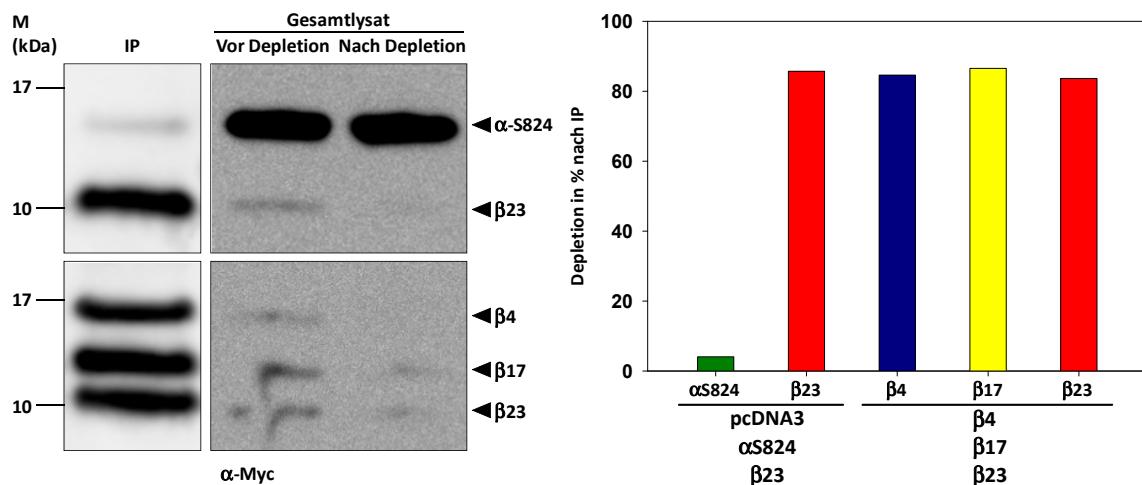


**Abb. 4.47:** Während der Co-IP werden spezifische Proteinbanden aus dem Gesamtproteom angereichert.

Im linken Teil der Abbildung ist ein Aliquot der vereinigten Proben aus Abb. 4.46 auf ein Gel aufgetragen und mit kolloidalem Blau angefärbt.

Nach der IP mit  $\alpha$ -Myc-Ak war statt der diffusen Spur im linken Teil ein distinktes Bandenmuster erkennbar. Die Spur wurde in fünf gleich große Sektionen geteilt, um die Komplexität der Proben zu verringern. Hieraus wurden nach Reduktion, Alkylierung und Fragmentierung durch Trypsin die Peptide für die MS gewonnen.

Die gleichen Kontrollen wurden für das andere Set der transfizierten Proben angefertigt und führten zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Die *de novo* Proteine konnten aus den Zelllysaten präzipitiert werden, jedoch zu unterschiedlichen Anteilen. Die IP war für die drei *de novo* amyloiden Proteine viel effizienter als für das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ S824. Während die Proben nur zu ca. 5 % vom  $\alpha$ -helikalen Protein depletiert wurden, war die Depletion und damit die Anreicherung in der IP mit ca. 85 % für alle *de novo* Proteine effizient. Hierbei war zu beachten, dass zum einen mehr  $\alpha$ -helikales Protein exprimiert wurde, zum anderen wurden wahrscheinlich bei den *de novo* Proteinen aus dem nativen Lysat wie beabsichtigt Aggregate herausgezogen, was bedeutet, dass eine ganze Traube von Molekülen an einer Ak-Kette hängen könnte, während für das lösliche  $\alpha$ -helikale Protein nur Monomere oder kleinere Oligomere an den Ak-Ketten hängen würden.



**Abb. 4.48: *De novo* Proteine wurden erfolgreich mit  $\alpha$ -Myc-Ak präzipitiert, jedoch zu unterschiedlichen Prozentsätzen.** Es wurden hier die IP bzw. die Proteinlysate vor der IP und nach der IP via Western Blot analysiert. Die Prozentsätze der Depletion (rechte Western Blots) wurden quantifiziert (Diagramm). Dies wurde für beide Sets (A: pcDNA3,  $\alpha$ S824,  $\beta$ 23; B:  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23) durchgeführt.

Es wurde also erwartet, dass mehr Proteine nach der IP mit Proben, welche die *de novo* amyloiden Proteine exprimierten, detektiert würden.

Um sicherzustellen, dass die Menge des präzipitierten  $\alpha$ -helikalen Proteins keinen großen Einfluss auf die detektierten Interaktionspartner haben würde, wurde ein zusätzliches Kontrollexperiment durchgeführt: Die dreifache Menge an mit  $\alpha$ -helikalem Protein transfizierten Zellen (schweres Medium, 120 Millionen Zellen) wurde 1 : 1 mit der dreifachen Menge an Kontrollzellen (pcDNA3, leichtes Medium) gemischt. Auch dieses Kontrollexperiment wurde wie die Hauptexperimente dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und der Massenspektrometrie unterzogen. Die Menge des präzipitierten  $\alpha$ -helikalen Proteins, welches in dem Kontrollexperiment herausgezogen worden war, wurde im

Vergleich zu Experimenten, wo wie in den Hauptversuchen 40 Millionen Zellen für die Lyse eingesetzt worden waren, quantifiziert. Tabelle 4.3 verdeutlicht, dass zwar das Verhältnis von  $\alpha$ -helikalem Protein in Gesamtzelllysat und  $\alpha$ -helikalem Protein in der IP größer als 1, jedoch kleiner als bei den Hauptversuchen war, was bedeutet, in den Kontrollversuchen wurde effektiv mehr  $\alpha$ -helikales Protein immunpräzipitiert.

**Tab. 4.3: Verhältnis Total/IP in Hauptexperiment und Kontrollexperiment des *de novo* Proteins  $\alpha$ S824.**

	Hauptexperiment (Total/IP)	Kontrollexperiment (Total/IP)
<b>Experiment 1</b>	230,6	39,5
<b>Experiment 2</b>	134,5	31,4
<b>Experiment 3</b>	176,2	58,39
<b>Experiment 4</b>	242,5	---
<b>Mittelwert</b>	195,9	43,2
<b>Standardabweichung</b>	50,1	14,1
<b>Hauptexperiment/ Kontrollexperiment</b>	<b>4,6</b>	

Tabelle 4.3 zeigt, dass die 4,6-fache Menge an  $\alpha$ S824 aus dem Kontrollexperiment im Vergleich zu den Hauptexperimenten gezogen wurde. Diese Kontrollen sollten sicherstellen, dass eine ähnliche Anzahl von Proteinen bei höherer präzipitierter Menge an  $\alpha$ S824 coimmunopräzipitierten, was der Fall war, s. 8.7 Anhang G.

#### 4.1.23 Detektion des Interaktoms der *de novo* Proteine mittels SILAC in Kombination mit Co-IP und Massenspektrometrie

Es wurden insgesamt 103 Proteine in der Massenspektrometrie identifiziert, welche mit  $\beta$ 23 interagieren (s. Tab. 8.7 Anhang G). Dagegen wurden nur sechs Proteine als Interaktoren mit  $\alpha$ S824 identifiziert, relativ zu Proben, welche nur mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren (s. Tab. 8.7 Anhang G). Ein Vergleich der spezifischen Interaktoren der Versuchsreihe B (s. Tab. 8.7 Anhang G) basierte auf den 57 spezifischen Interaktoren für  $\beta$ 23 (eine Teilmenge der 103 Interaktoren), 50 spezifischen Interaktoren für  $\beta$ 17 und 30 spezifischen  $\beta$ 4-Interaktoren. Ca. 80 % der  $\beta$ 4-Interaktoren und 60 % der  $\beta$ 17-Interaktoren wurden ebenfalls als  $\beta$ 23-Interaktoren identifiziert.

Die meisten der  $\beta$ 23-Interaktoren sind cytoplasmatische Proteine (59 Proteine), gefolgt von nukleären (39) und mitochondrialen (7) Proteinen. Die mit  $\beta$ 23 interagierenden Proteine zeigten keine Präferenz für eine bestimmte Funktion in der Zelle, es wurden viele Interaktoren detektiert, welche verschiedene essentielle zelluläre Funktionen ausüben. Die größte Gruppe der detektierten Proteine stellten die in den Translationsprozess involvierten

Proteine dar, gefolgt von Proteinen, welche an Bildung und Aufrechterhaltung des Zytoskeletts, sowie DNS-Modellierung, Transkription und mitochondrialen Funktionen beteiligt sind. Es wurden alleine 14 verschiedene eukaryotische Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) als Interaktoren nachgewiesen, wobei generell bei allen Interaktoren nicht festgestellt werden kann, ob sie direkt oder indirekt mit den *de novo* Proteinen interagieren. eIFs wurden auch als spezifisch mit  $\beta 4$  und  $\beta 17$  interagierende Proteine detektiert, ebenso Proteine der Transkription, des Zytoskeletts und der Mitochondrien.

Es wurden damit in der massenspektrometrischen Analyse der Interaktionspartner viele für die Zelle essentielle Proteine identifiziert.

#### 4.1.24 Interaktoren der *de novo* amyloiden Proteine weisen eine höhere Molmasse, niedrigere Hydrophobizität und mehr IURs als das detektierte Gesamtproteom auf und interagieren ihrerseits vermehrt mit essentiellen Proteinen

Eine weitergehende Untersuchung der Interaktoren ergab, dass die 103 mit  $\beta 23$  interagierenden Proteine eine verhältnismäßig größere Molmasse als der Durchschnitt des Proteoms besitzen (s. Abb. 4.49).

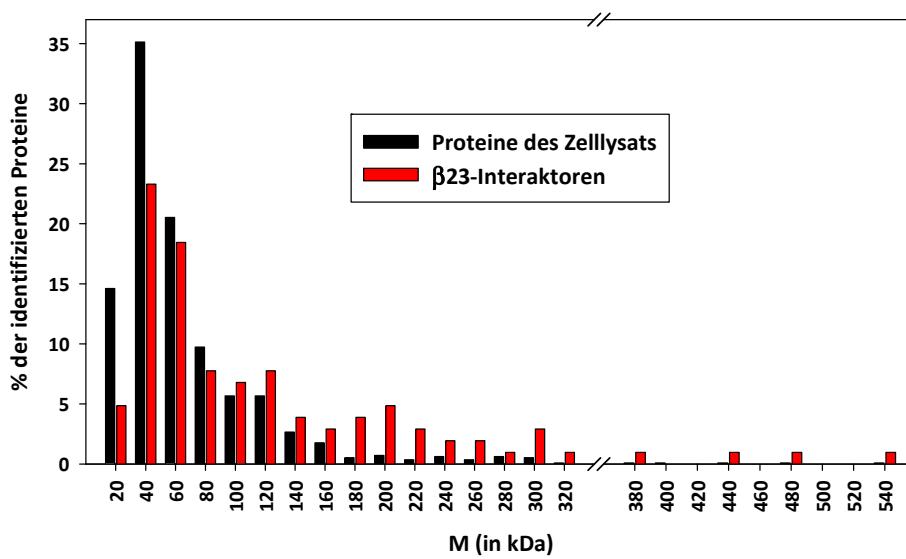
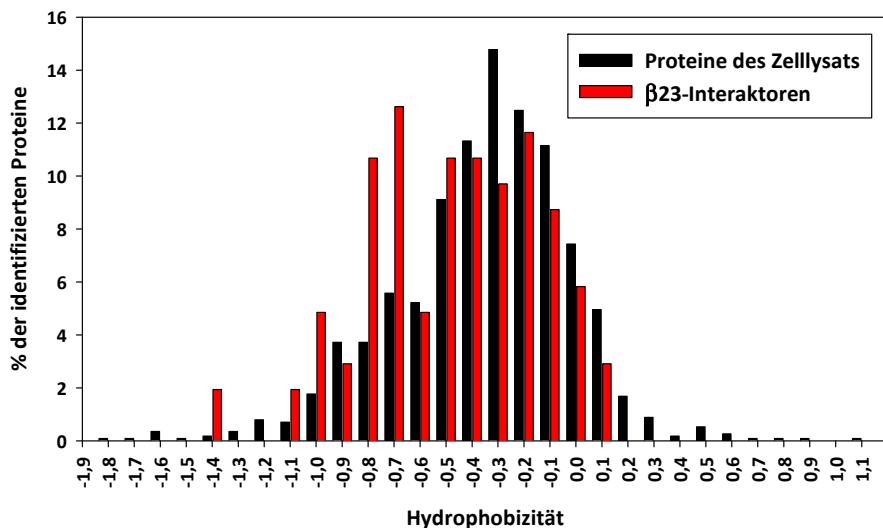


Abb. 4.49:  $\beta 23$ -Interaktoren weisen eine höhere Molmasse als die detektierten Proteine des Zelllysats auf.  
Die Summe der identifizierten Kontrollproteine und die der  $\beta 23$ -Interaktoren wurde gleich 100 gesetzt und auf die jeweiligen Molmassen bezogen, um die prozentualen Anteile der identifizierten Proteine eines jeden Molmassenintervalls zu ermitteln.

Proteine mit einer Molmasse von  $\geq 160$  kDa waren deutlich im  $\beta 23$ -Interaktom im Vergleich zu den 1088 identifizierten Proteinen des Gesamtzelllysats angereichert.

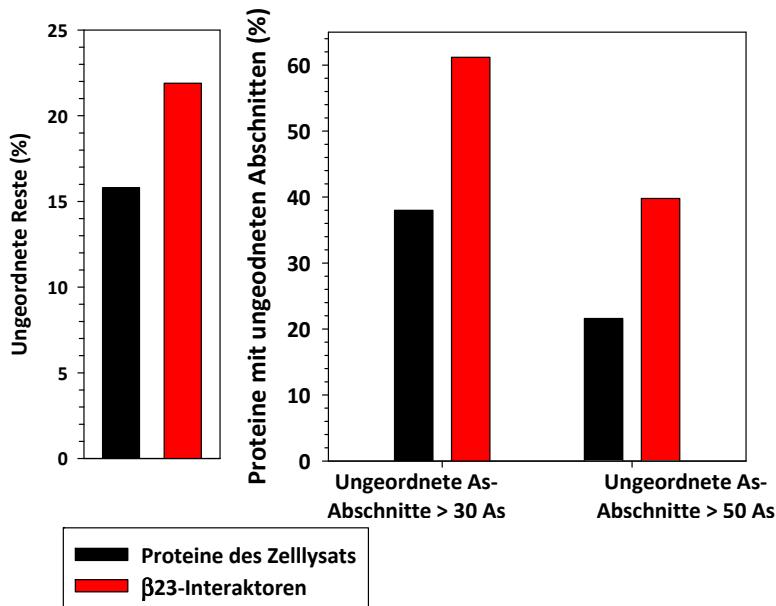
Für die  $\beta 23$ -Interaktoren wurde zudem eine niedrigere durchschnittliche Hydrophobizität (Kyte und Doolittle, 1982) ermittelt (Abb. 4.50).



**Abb. 4.50:**  $\beta_{23}$ -Interaktoren weisen eine niedrigere Hydrophobizität als die Durchschnittsproteine des Zelllysats auf.

Um die prozentualen Anteile zu ermitteln, wurde die Summe der identifizierten 1088 Kontrollproteine und die der 103  $\beta_{23}$ -Interaktoren gleich 100 gesetzt und entsprechend ihrer jeweiligen Hydrophobizität nach Kyte/Doolittle eingruppiert.

Eine niedrigere Hydrophobizität des  $\beta_{23}$ -Interaktoms gab bereits einen ersten Hinweis auf eine mögliche Rolle intrinsisch unstrukturierter Regionen (IURs). Ein Vergleich mit den Proteinen des Gesamtzelllysats ergab, dass das  $\beta_{23}$ -Interaktom eine größere Fraktion von As-Resten in IURs, basierend auf DisoDB-Datenbank, DisEMBL und IUPred für unstrukturierte Regionen (Dosztanyi et al., 2005; Linding et al., 2003), aufweist (s. Abb. 4.51 A).



**Abb. 4.51:**  $\beta_{23}$ -Interaktoren besitzen einen höheren Prozentsatz an Aminosäuren in intrinsisch ungeordneten Proteinabschnitten (IURs) und mehr IURs als die detektierten Proteine des Zelllysats.

In Teilabbildung A ist der Prozentsatz der As in ungeordneten Sequenzen der  $\beta_{23}$ -Interaktoren dargestellt.

Unter B wurden Fraktionen von Proteinen mit ungeordneten Sequenzen von mehr als 30 oder 50 As aufgetragen. Der Grad der Unordnung (Disorder) wurde mit Hilfe der Diso-Datenbank (DisoDB) analysiert.

Wurden Fraktionen der Proteine mit IURs berücksichtigt, welche mehr als 30 oder 50 Reste beinhalten, tritt eine signifikante Erhöhung im Falle des  $\beta_{23}$ -Interaktoms verglichen mit dem Zelllysat auf (s. Abb. 4.51 B). Beispielsweise nehmen ~60 % der  $\beta_{23}$ -Interaktoren wenigstens ein unstrukturiertes Segment mit 30 As ein, verglichen mit nur ca. 40 % beim Gesamtproteom. Ebenso besitzen ca. 40 % der Proteine des  $\beta_{23}$ -Interaktoms IURs mit mehr als 50 As gegenüber ~20 % des Gesamtproteoms des Zelllysats. Darüberhinaus finden sich im

$\beta 23$ -Interaktom durchschnittlich 3 ungeordnete Segmente pro Protein, während im Gesamtproteom nur ~1,3 vorliegen.

Verglichen mit dem Gesamtproteom weisen die IURs des  $\beta 23$ -Interaktoms eine deutliche Verlängerung dieser Sequenzen auf (s. Abb. 4.52), wobei 22 % der IURs des  $\beta 23$ -Interaktoms mehr als 80 As-Reste und 13 % 100 bis 400 As-Reste umfassen.

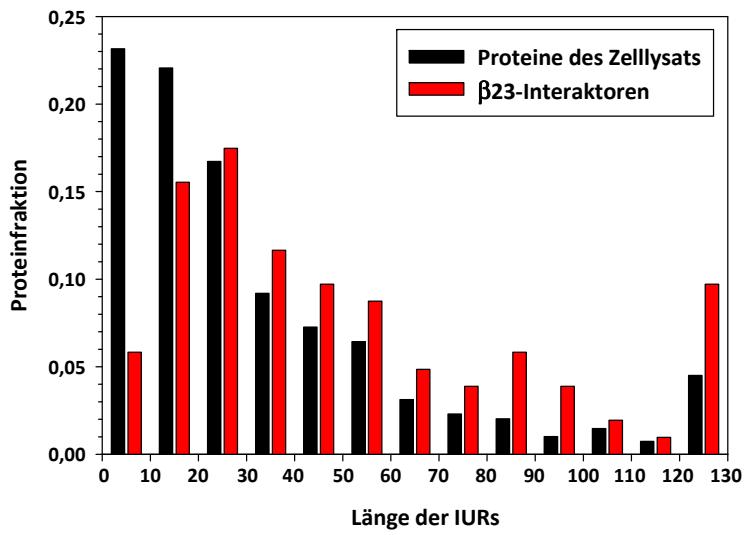


Abb. 4.52: Proteine des  $\beta 23$ -Interaktoms besitzen deutlich längere IURs als die Proteine des Gesamtproteoms.

Die Länge der IURs dargestellt in As wurde gegen den Anteil der Proteine im  $\beta 23$ -Interaktom bzw. das Gesamtproteom des Zelllysats aufgetragen. Der Grad der Unordnung (Disorder) wurde mit Hilfe der Diso-Datenbank (DisoDB) analysiert.

Die IURs sind mit polaren As und As mit der Neigung, Biegungen innerhalb von

Proteinen zu formen, angereichert, wie z.B. mit M, K, R, E, S, Q und P. Dagegen sind aromatische und hydrophobe As wie W, Y, F, C, I und V geringer vertreten, wie es generell für ungeordnete Proteinsequenzen beschrieben wurde (Dunker et al., 2008).

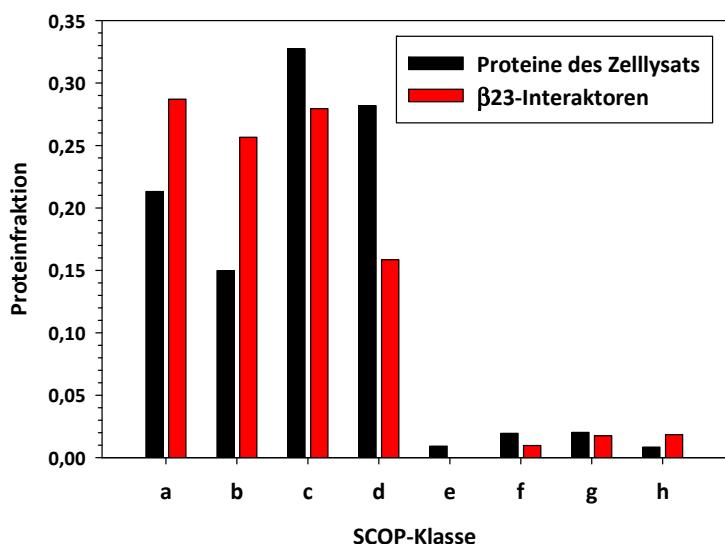


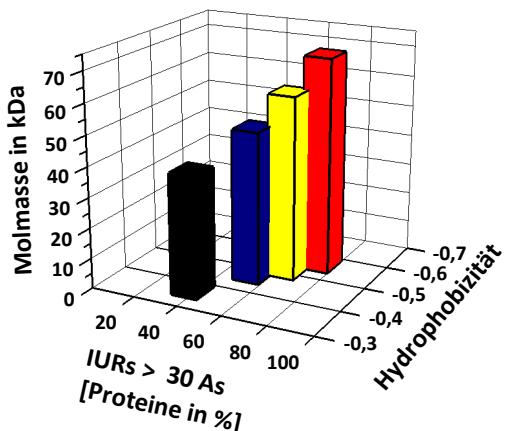
Abb. 4.53: Verteilung der Faltungsklassen nach SCOP im Gesamtproteom des Zelllysats und des  $\beta 23$ -Interaktoms.

Die relative Häufigkeit der verschiedenen Faltungsklassen von Proteinen mit identifizierter Faltungstopologie (69  $\beta 23$ -Interaktoren und 804 Lysatproteine) wurde mit Hilfe von SCOP bestimmt. Repetitive Faltungsklassen innerhalb eines Proteins wurden nur einmal gewertet. Die Klassifikation nach SCOP lautet folgendermaßen: a, alle  $\alpha$ ; b, alle  $\beta$ ; c,  $\alpha/\beta$ ; d,  $\alpha+\beta$ ; e, Multidomänenproteine ( $\alpha$  und  $\beta$ ); f, Membran und Zelloberflächenproteine und -peptide; g, kleine Proteine; h, Doppelwendel-Proteine.

Die Analyse verschiedener SCOP-Faltungsklassen der Domänen bei den  $\beta 23$ -Interaktoren (s. Abb. 4.53) ergab eine ähnliche Verteilung wie die des Zelllysats. Jedoch enthielten die  $\beta 23$ -

Interaktoren signifikant mehr  $\beta$ -Domänen (SCOP-Klasse b) mit 25 % relativ zu 15 % aller Domänen mit klassifizierter Faltung und eine geringere Anzahl  $\alpha+\beta$ -Domänen (SCOP-Klasse d). Unter den  $\beta23$ -Interaktoren, deren Faltung überwiegend  $\beta$ -Stränge beinhaltet, befinden sich u.a. die VDACs als  $\beta$ -Fass-Proteine und die Filamine, welche repetitive Ig-Domänen besitzen.

Ein Vergleich der Interaktoren von  $\beta4$ ,  $\beta17$  und  $\beta23$  führte ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Interaktoren der *de novo* amyloiden Proteine eine höhere Molmasse, eine niedrigere Hydrophobizität und einen höheren Prozentsatz an IURs besitzen (s. Abb. 4.54). Dabei korreliert die Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine mit einem Anstieg der Molmasse und einer Abnahme der Hydrophobizität ihrer Interaktoren.



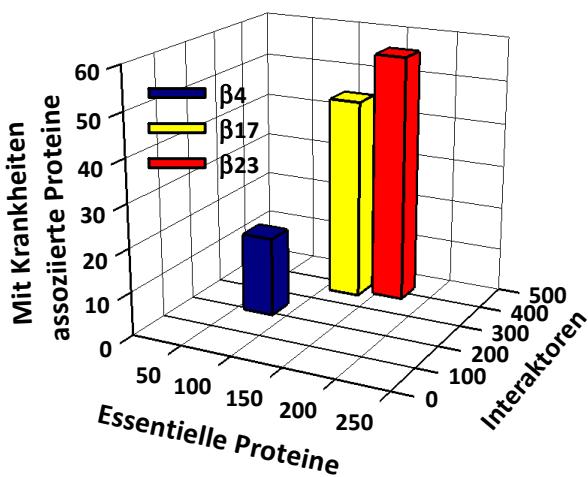
**Abb. 4.54:** Der graduelle Anstieg der Zytotoxizität von  $\beta4$ ,  $\beta17$  und  $\beta23$  korreliert mit einem Anstieg der Molmasse und einem erhöhtem Prozentsatz von IURs im präferentiellen Interaktom von  $\beta4$ ,  $\beta17$  und  $\beta23$ , während im Falle der Hydrophobizität eine inverse Korrelation besteht.

Es wurde die durchschnittliche Molmasse in kDa vom Gesamtproteom des Lysats und der mit den amyloiden Proteinen interagierenden Interaktoren gegen das durchschnittliche prozentuale Auftreten von IURs mit mehr als 30 As und die durchschnittliche Hydrophobizität nach Kyte und Doolittle aufgetragen.

Die strukturelle Flexibilität und größere Molmasse der Interaktoren der *de novo* amyloiden Proteine legte nahe, dass diese Proteine in eine höhere Anzahl an funktionellen Protein-Interaktionen involviert sein dürften. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Verknüpfung der 103  $\beta23$ -Interaktoren mit dem zellulären Proteinnetzwerk *in silico* analysiert. Unter Benutzung der HPRD (Keshava Prasad et al., 2009) stellte es sich heraus, dass durchschnittlich jedes Protein der  $\beta23$ -Interaktoren mit ~11 verschiedenen Proteinen interagieren kann, verglichen mit durchschnittlich ~4 Proteinen der Proteine des analysierten Zelllysats und ~1 Protein pro Protein der HPRD. Insgesamt sind 1107 physikalische Assoziationen mit verschiedenen Proteinen möglich, die wiederum mit einer großen Anzahl weiterer Proteine interagieren können. Bemerkenswerterweise gehen die meisten der  $\beta23$ -Interaktoren keine oder nur wenige Interaktionen untereinander ein, so dass wahrscheinlich die Assoziationen mit den  $\beta$ -Aggregaten einige der funktionellen Komplexe zerstören dürften. Es wurde verschiedentlich berichtet, dass essentielle Proteine oft wichtige Knotenpunkte eines Proteinnetzwerkes repräsentieren (Goh et al., 2007; Haynes et al., 2006; Jeong et al., 2001).

Jeder der  $\beta$ 23-Interaktoren interagiert durchschnittlich mit 4 verschiedenen essentiellen Proteinen, verglichen mit nur einem essentiellen Protein pro Lysatprotein und 0,2 pro Protein der HPRD. Dabei assoziieren die 103  $\beta$ 23-Interaktoren direkt oder indirekt mit insgesamt 415 der ~2700 essentiellen humanen Proteine. Darüberhinaus wurde eine mehr als 5-fach höhere Assoziation der  $\beta$ 23-Interaktoren zu Proteinen festgestellt (s. auch 8.7 Anhang G), welche im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie *M. Alzheimer*, *C. Huntington* oder *M. Parkinson* als Interaktoren nachgewiesen wurden (Raychaudhuri et al., 2009), verglichen mit den detektierten Proteinen des Zelllysats.

Sollte die Annahme stimmen, dass eine Beeinträchtigung funktioneller Proteininteraktionen zu der beobachteten Zytotoxizität von  $\beta$ 23 beiträgt, dann dürften die für  $\beta$ 23 beschriebenen Eigenschaften seiner Interaktoren sich von denjenigen des  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 unterscheiden. Tatsächlich wurde eine hohe Korrelation zwischen der Abstufung der Zytotoxizität von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 und dem Grad der Konnektivität ihrer entsprechenden Interaktoren dokumentiert. Die bevorzugten Interaktoren von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 sind demnach physikalisch mit 217, 358 und 369 verschiedenen Proteinen verbunden, einschließlich 70, 11 und 143 essentiellen Proteinen und 17, 37 bzw. 46 Proteinen, welche im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen worden waren (s. Abb. 4.55).



**Abb. 4.55:** Die Zahl der präferentiellen Interaktoren von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 korreliert mit ihrer Anzahl interagierenden Proteinen, welche essentiell und in neurodegenerative Krankheiten involviert sind.

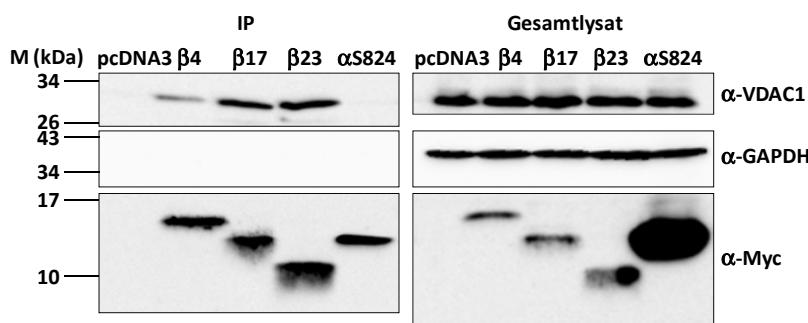
Die Gesamtzahl der für  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 konnektiven Interaktoren ihrer präferentiellen Interaktoren wurde gegen die ermittelten mit neurodegenerativen Krankheiten assoziierten Proteine (Raychaudhuri et al., 2009) und essentielle Proteine (HPRD) aufgetragen.

Zusammenfassend korreliert die Fähigkeit der *de novo* amyloiden Proteine  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 mit strukturell flexiblen Proteinen zu interagieren mit dem Ausmaß der funktionellen Beeinträchtigung dieser und weiterer Interaktoren und einer Interferenz mit essentiellen zellulären Funktionen.

#### 4.1.25 VDAC1 wird nach Co-IP mit *de novo* amyloiden Proteinen angereichert

Im Folgenden wurden einige der nachgewiesenen hoch angereicherten Interaktoren im Hinblick auf ihre Interaktionen mit den *de novo* Proteinen sowohl biochemisch als auch zellbiologisch genauer charakterisiert.

Ein Interaktionspartner, welcher hoch angereichert in den massenspektrometrischen Experimenten gefunden wurde, war VDAC1. VDAC1 gehört wie VDAC2 und VDAC3, welche ebenfalls hoch angereichert waren, zu den Porinen der äußeren mitochondrialen Membran. Hier wurde noch einmal auf biochemischem Wege gezeigt, dass VDAC1 bei einer Co-IP im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA3) und dem  $\alpha$ -helikalen Protein  $\alpha$ S824 angereichert wird. VDAC1 wurde durch einen monoklonalen Ak erkannt und im Gesamtlysat auf korrekter Höhe bei ca. 30 kDa dargestellt. Als präexistentes Protein waren keine Unterschiede im Expressionslevel nach Transfektion mit den *de novo* Proteinen detektierbar. Es wird deutlich, dass das  $\alpha$ -helikale Protein hier wieder im Gesamtzelllysat höher exprimiert wurde im Vergleich zu den *de novo* amyloiden Proteinen, nach der IP aber nicht mehr als bei den amyloiden Proteinen immunpräzipitiert wurde. Dennoch war eine klare Anreicherung des VDAC1 in den Proben  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 zu verzeichnen, wobei die Präzipitation besonders effizient bei den beiden Proben  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 war.



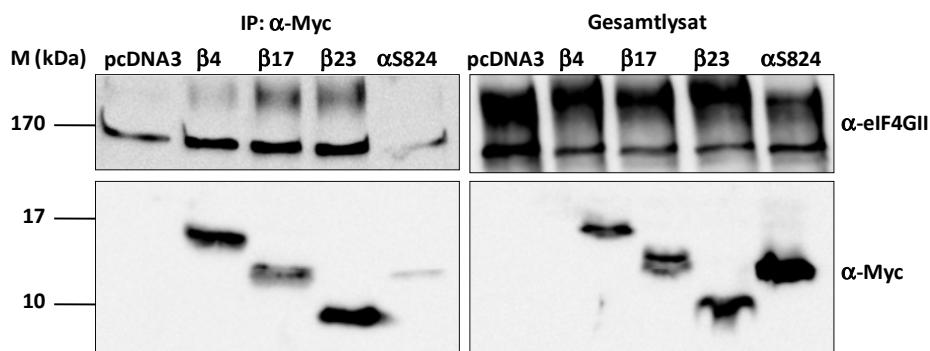
**Abb. 4.56: VDAC1 interagiert mit  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23.**  
HEK293T-Zellen wurden wie in den SILAC-Experimenten transzitziert, 24 h später unter nativen Bedingungen lysiert und eine Co-IP durchgeführt. Die Co-IPs wurden mit Hilfe von Western Blots analysiert.

GAPDH besaß bei diesem Experiment eine doppelte Kontrollfunktion: Einerseits ging aus seiner Präsenz zu gleichen Mengen in den verschiedenen Proben des Gesamtzelllysates hervor, dass gleiche Mengen Lysat eingesetzt wurden, andererseits wurde das Protein nicht coimmunpräzipitiert, was mit den Ergebnissen aus den SILAC-Experimenten übereinstimmt. Es übernahm hier eine Negativ-Kontrollfunktion, so dass sichergestellt war, keine unspezifischen Proteine zu präzipitieren.

Für VDAC1 haben sich damit die Resultate aus der massenspektrometrischen Analyse auch biochemisch bestätigt.

#### 4.1.26 eIF4GII wird nach IP der *de novo* amyloiden Proteine angereichert und colokalisiert mit ihnen

In der massenspektrometrischen Analyse der Interaktionspartner wurden viele eIFs identifiziert und repräsentativ einer von diesen, welcher in den ersten Analysen besonders hoch angereichert war, für die biochemische und zellbiologische Verifizierung dieses Ergebnisses ausgewählt, nämlich eIF4GII. In Abbildung 4.57 ist die Co-IP des eIF4GII dargestellt. Beim Gesamtlysat war eine scharfe Bande nach Dekoration des Western Blots mit  $\alpha$ -eIF4GII zu erkennen, welche die erwartete Molmasse von 170 kDa besaß. Bei ca. 200 kDa befand sich auch bei den mehrmals durchgeführten Versuchen eine diffuse, ausgedehnte Bande.



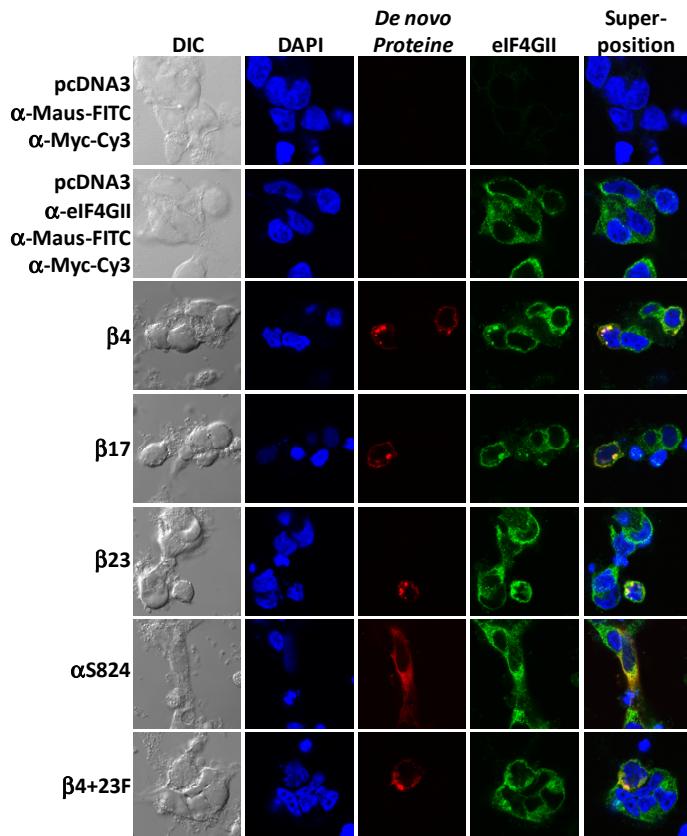
durchgeführt. Mit Hilfe des Western Blots wurden die IPs analysiert.

**Abb. 4.57:** eIF4GII wird in der Co-IP mit den amyloiden Proteinen angereichert.

HEK293T-Zellen wurden wie in den SILAC-Experimenten transfiziert, 24 h später unter nativen Bedingungen lysiert und eine Co-IP

Die distinkte Bande, welche dem unmodifizierten eIF4GII zugeordnet wurde, erschien auch in der Co-IP, für die Proteine  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 in angereicherter Menge. Jedoch gab es hier stets einen deutlichen Hintergrund bei der Kontrolle (pcDNA3) und dem  $\alpha$ -helikalen Protein. Auch die diffuse Bande wurde bei den Proben der *de novo* amyloiden Proteine angereichert, bei der Kontrolle und dem  $\alpha$ -helikalen Protein ist die diffuse Bande jedoch nicht mehr sichtbar, so dass offenbar von dieser Form eine spezifischere Anreicherung stattgefunden hatte. Auch die immunzytochemische gemeinsame Darstellung von eIF4GII und den *de novo* amyloiden Proteinen verifizierte das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse. Die *de novo* amyloiden Proteine zeigten wie erwartet Aggregate, inklusive der modifizierten Version  $\beta$ 4+23F, das  $\alpha$ -helikale Protein war homogen über das Zytoplasma verteilt. Ebenso über das Zytoplasma verteilt lag eIF4GII vor, wie erwartet nicht im Nukleus, jedoch war es bei genauerem Hinsehen nicht homogen verteilt. Es lag eher in sehr kleinen granulären Strukturen vor, die aber keine Aggregate bildeten. Zusammen mit den *de novo* Proteinen trat eine deutliche Colokalisation von eIF4GII in Form von Coaggregaten auf. Jedoch war auch noch

lösliches Material detektierbar, so dass anscheinend eIF4GII nur partiell in Aggregate rekrutiert wurde.

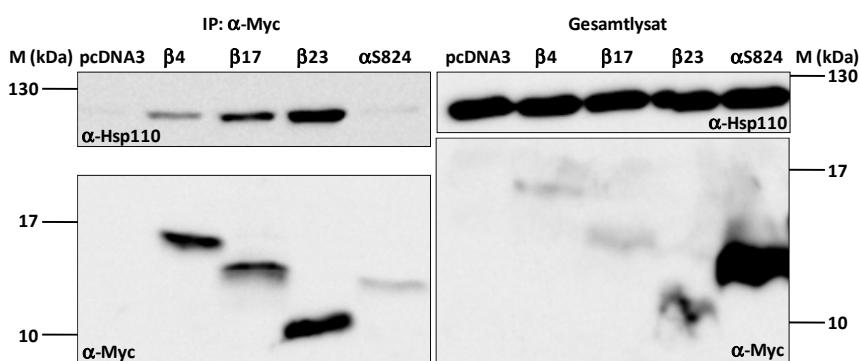


**Abb. 4.58: eIF4GII colokalisiert mit den *de novo* amyloiden Aggregaten.** HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden codierend für die *de novo* Proteine elektroporiert und 24 h später fixiert. Nach Permeabilisierung erfolgten sukzessive die einzelnen Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern, wobei die Reihenfolge mit  $\alpha$ -eIF4GII (monoklonal aus der Maus),  $\alpha$ -Maus-FITC und schließlich  $\alpha$ -Myc-Cy3 stets eingehalten wurde, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Beim letzten Inkubationsschritt wurde zudem DAPI zur Lokalisierung des Nukleus zugesetzt. Nach Einbetten in Mounting-Medium erfolgte die Aufnahme der Bilder mit dem konfokalen Mikroskop von Leica, Ölimmersionsobjektiv 63-fach.

Auch für eIF4GII konnten damit die massenspektrometrischen Ergebnisse biochemisch und mikroskopisch verifiziert werden.

#### 4.1.27 Hsp110 wird nach IP der *de novo* amyloiden Proteine angereichert und colokalisiert mit ihnen

In den massenspektrometrischen Analysen wurde stets Hsp110 in Gegenwart der *de novo* amyloiden Proteine hoch angereichertdetektiert. Zudem konnte ein Anstieg der Anreicherung entsprechend der zuvor beobachteten Zytotoxizität registriert werden:  $\beta 4 < \beta 17 < \beta 23$ . Deshalb wurde die Rolle des Hsp110 in Gegenwart der *de novo* amyloiden Proteine mit verschiedenen Methoden analysiert.

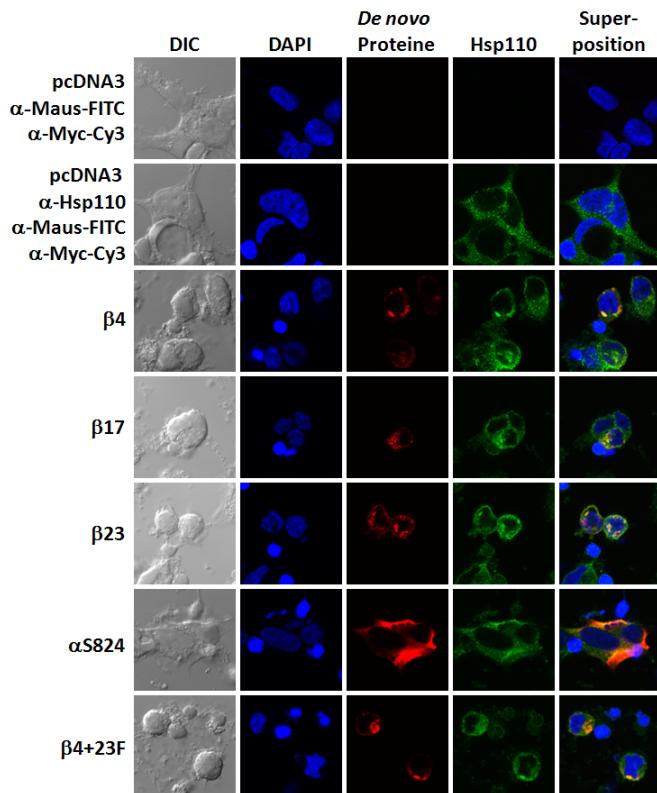


**Abb. 4.59: Hsp110 wird mit den *de novo* amyloiden Proteinen in der Co-IP angereichert.**

HEK293T-Zellen wurden mit den *de novo* Proteinen transzitert, 24 h später wurden sie unter nativen Bedingungen lysiert und eine Co-IP wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

Auch in diesem Fall konnte mit Hilfe der Co-IP eine Anreicherung des Hsp110 verifiziert werden. Die Mengen des präexistierenden Hsp110 im Gesamtlysat unterschieden sich nicht in Gegenwart der exprimierten *de novo* Proteine. Nach der Co-IP war jedoch eine deutliche Anreicherung des Hsp110 in Gegenwart der amyloiden *de novo* Proteine zu verzeichnen. Dabei unterschied sich das Muster von der Co-IP von dem mit VDAC1 und eIF4GII. Die Analyse des VDAC1 ergab eine deutlichere Anreicherung in Gegenwart von  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23, bei eIF4GII war für alle drei *de novo* amyloiden Proteinen eine deutlichere Anreicherung zu erkennen. Im Falle des Hsp110 war die Anreicherung eine andere: Hier war eine Abstufung der Anreicherung von  $\beta$ 4 <  $\beta$ 17 <  $\beta$ 23 vorhanden.

Die Interaktion der *de novo* amyloiden Proteine konnte nicht nur in den SILAC-Experimenten und der Co-IP nachgewiesen werden, es konnte auch ein indirekter Nachweis ihrer Interaktion durch eine Colokalisierung von Hsp110 mit den *de novo* Proteinen geführt werden. Die Bilder mit den *de novo* amyloiden Proteinen zeigten zum einen wieder Aggregate, zum anderen fehlten auch in allen Fällen Filopodien.



**Abb. 4.60: Hsp110 colokalisiert mit den Aggregaten der *de novo* amyloiden Proteine.** HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden codierend für die *de novo* Proteine elektroporiert und 24 h später fixiert. Nach Permeabilisierung erfolgten sukzessive die einzelnen Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern, wobei die Reihenfolge mit  $\alpha$ -Hsp110 (monoklonal aus der Maus),  $\alpha$ -Maus-FITC und schließlich  $\alpha$ -Myc-Cy3 stets eingehalten wurde, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Beim letzten Inkubationsschritt wurde zudem DAPI zur Lokalisierung des Nukleus zugesetzt. Nach Einbetten in Mounting-Medium erfolgte die Aufnahme der Bilder mit dem konfokalen Mikroskop von Leica, Ölimmersionsobjektiv 63-fach.

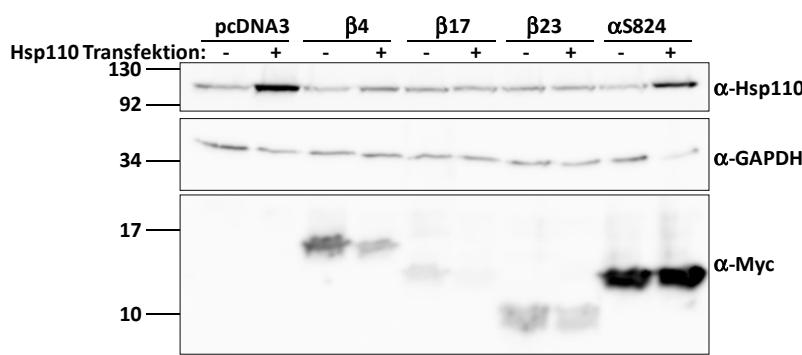
Es fand auch hier eine partielle Colokalisierung mit Hsp110 statt, ein Teil des Hsp110 schien in Aggregate rekrutiert zu werden. Ein nicht unbedeutlicher Teil lag jedoch noch homogen über die Zellen verteilt vor. Die Aggregate des  $\beta$ 4+23F colokalisierten ebenfalls mit Hsp110. Wie erwartet, wurde der Nukleus durch Hsp110-Ak nicht angefärbt, zudem war auch hier eine gewisse Granularität des Hsp110 zu erkennen (s. Abb. 4.60).

Hsp110 colokalisierte mit  $\alpha$ S824, weil beide im Zytoplasma verteilt vorlagen. Der gleiche Versuch wurde auch mit einer Variation durchgeführt, nämlich mit Fixierung und Präparation 9 h statt 24 h nach Transfektion der Zellen. Bereits nach dieser Zeit hatten sich Aggregate gebildet und es fand eine Colokalisation zwischen den *de novo* amyloiden Proteinen und Hsp110 statt (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt bestätigte sich auch mit Hsp110, dass eine Colokalisation und Co-IP mit den *de novo* amyloiden Proteinen stattfindet.

#### 4.1.28 Präexistentes überexprimiertes Hsp110 kann die Zytotoxizität der *de novo* Proteine $\beta$ 4 und $\beta$ 17 partiell aufheben

Da Hsp110 als Interaktor der *de novo* amyloiden Proteine in der MS nachgewiesen und die Interaktionen biochemisch und zellbiologisch bestätigt worden waren, sollte das molekulare Chaperon zusammen mit den *de novo* Proteinen überexprimiert werden, um eine eventuelle Modulation der Toxizität zu überprüfen. Hsp110 wurde dazu in einen mammalischen Vektor kloniert und in HEK293T-Zellen erfolgreich überexprimiert. Im nächsten Schritt wurde es zusammen mit den *de novo* Proteinen cotransfiziert, lysiert und *per* Western Blot analysiert und parallel dazu MTT-Tests durchgeführt.

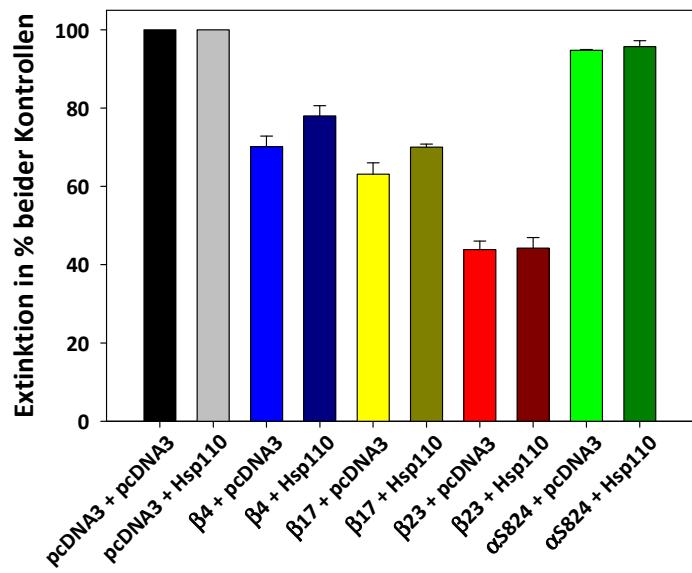


**Abb. 4.61:** Die Überexpression von Hsp110 ist bei synchroner Cotransfektion mit *de novo* amyloiden Proteinen supprimiert.

HEK293T-Zellen wurden mit *de novo* Proteinen und Hsp110 *via* Elektroporation transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen lysiert und parallel dazu *per* MTT-Test analysiert (s. Abb. 4.62).

Abb. 4.61 verdeutlicht, dass wieder das gleiche Phänomen wie mit der GFP-Luc oder anderen coexprimierten Proteinen auftrat: Die *de novo* Proteine behindern die Expression anderer Proteine. Während bei  $\beta$ 4 noch ein minimaler Anstieg von Hsp110 über die bereits endogen synthetisierte Menge hinaus vorlag, wurde in Gegenwart von  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 kein Anstieg der Hsp110 Menge verzeichnet.

Parallel zu den Western Blots durchgeführte MTT-Tests belegten, dass zwar ein Trend zur verminderten Zytotoxizität bei  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 vorhanden war, nicht bei  $\beta$ 23, jedoch unterschieden sich die Werte nur um ca. 7 % bei ca. 4 % Standardabweichung (s. Abb. 4.62).

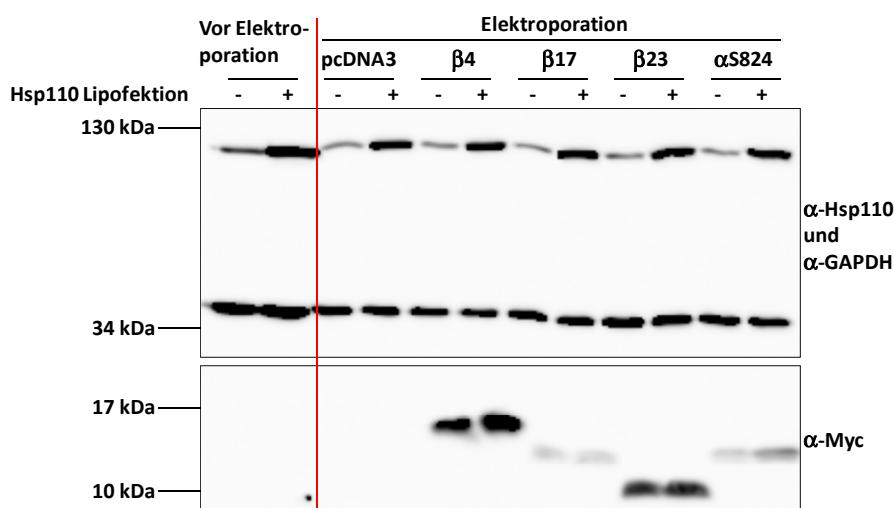


**Abb. 4.62: Die Zellviabilität von  $\beta 4$  und  $\beta 17$  steigt nach synchroner Expression von Hsp110 nur leicht an.**

HEK293T-Zellen wurden mit *de novo* Proteinen transfiziert und parallel mit einem leeren Vektor oder Hsp110 durch Elektroporation cotransfiziert. Sie wurden ausgesät und drei Tage später wurde von den Zellen (125.000/Well) ein MTT-Test durchgeführt. Die Werte der Proben mit dem leeren Vektor und *de novo* Proteinen wurden auf die nur mit pcDNA3 transfizierte Kontrolle normiert, die Proben mit Hsp110 wurden auf die mit leerem Vektor und Hsp110 transfizierte Kontrolle normiert.

Aufgrund des Problems, dass Proteine synchron cotransfizierter

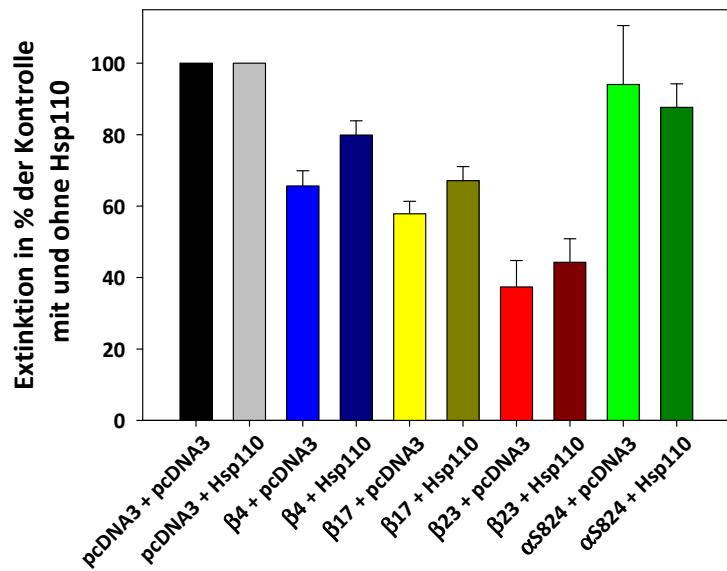
Plasmide in Gegenwart von *de novo* amyloiden Proteinen, besonders  $\beta 23$ , nicht exprimiert werden, wurde eine andere Strategie gewählt: Zunächst wurde Hsp110 mittels Lipofektion transfiziert und nach 24 h die transfizierten Zellen *via* Elektroporation mit *de novo* Proteinen cotransfiziert. Für die Transfektion von Hsp110 wurde Lipofektion gewählt, da *per* Elektroporation nicht so viele Zellen auf einmal transfiziert werden können. Dennoch sollte die Transfektionsmethode für die *de novo* Proteine genauso wie bei den vorhergehenden Versuchen durchgeführt werden, deshalb wurden diese mittels Elektroporation transfiziert.



**Abb. 4.63: Expression von *de novo* Proteinen nach vorheriger Transfektion mit Hsp110 supprimiert die Hsp110-Expression nicht.**

HEK293T-Zellen wurden erst mit Hsp110 *via* Lipofektion transfiziert. 24 h Stunden später wurden die so vortransfizierten Zellen mit den *de novo* Proteinen mittels Elektroporation transfiziert. Parallel wurde ein Aliquot „Vor Elektroporation“ entnommen, um die gebildete Menge an Hsp110 vor der Elektroporation nachzuweisen. Drei Tage später wurden die Zellen mit den *de novo* Proteinen und überexprimiertem Hsp110 lysiert und mit Hilfe des Western Blots analysiert.

Es sollte also in den mit Hsp110 vortransfizierten Zellen mehr präexistentes Hsp110 vorhanden sein, zusätzlich zu dem bereits vorhandenen endogen codiertem Hsp110.



**Abb. 4.64:** Präexistentes überexprimiertes Hsp110 kann zu einer partiellen Aufhebung der Zytotoxizität durch die *de novo* amyloiden Proteine führen.

HEK293T-Zellen wurden erst mit Hsp110 via Lipofektion transfiziert. 24 h Stunden später wurden die so vortransfizierten Zellen mit den *de novo* Proteinen via Elektroporation transfiziert. Drei Tage später wurden MTT-Tests von den zehn Proben durchgeführt. Diese wurden dreimal unabhängig voneinander in Duplikaten mit je 125.000 ausgesäten Zellen pro Well durchgeführt.

Die Strategie der Vorexpression von Hsp110 war, wie Abb. 4.63

zeigt, erfolgreich. Die Hsp110-Mengen waren, obwohl *de novo* amyloide Proteine zugegen waren, annähernd gleich. Die erfolgreiche Überexpression des Hsp110 zeigte sich auch in der Immunfluoreszenz (s. Abb. 4.65). Die Expression des Hsp110 vor den *de novo* amyloiden Proteinen zeigte jetzt ein deutlicheres Resultat: Die Zytotoxizität von  $\beta 4$  und  $\beta 17$  wurde deutlich verringert (Zellviabilität 65 %  $\beta 4$  allein, 79 % mit Hsp110; 57 %  $\beta 17$  allein, 68 % mit Hsp110). Bei  $\beta 23$  deutete sich lediglich ein Trend zur Verringerung der Zytotoxizität durch Hsp110 an, welcher aber nicht signifikant war. Die Zytotoxizität von  $\alpha S824$  stieg in Gegenwart von überexprimiertem Hsp110 leicht an, jedoch war dieser Anstieg auch nicht signifikant.

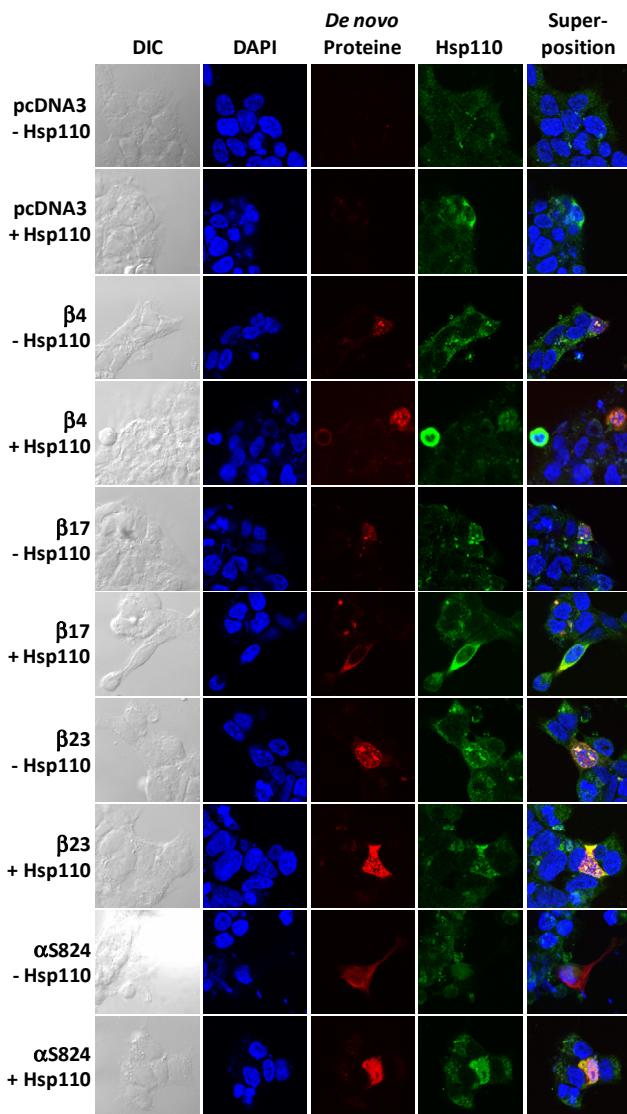
Zusammengenommen führte eine erhöhte, präexistente Menge an Hsp110 zu einer Verminderung der Toxizität bei Zellen mit exprimiertem  $\beta 4$  und  $\beta 17$ .

#### 4.1.29 Überexprimiertes Hsp110 vermindert partiell die Aggregatbildung der *de novo* Proteine $\beta 4$ und $\beta 17$ und die pathologische Morphologie der Zellen

Parallel zu den Analysen des überexprimierten Hsp110 in Western Blot und MTT-Test wurden Zellen mittels konfokaler Mikroskopie daraufhin untersucht, ob die Überexpression des Hsp110 auch immunzytochemisch detektierbar wäre. Die Versuche wurden wie der MTT-Test und der korrespondierende Western Blot drei Tage nach Elektroporation durchgeführt. Die Hsp110-Mengen erschienen in einigen Zellen unter dem Mikroskop erhöht; wo Hsp110 stark überexprimiert wurde und zusammen mit *de novo* amyloiden Proteinen exprimiert wurde, fiel bei manchen Zellen auf, dass *de novo* amyloide Proteine vorhanden waren, jedoch keine Aggregate, oder nur sehr diffuse. Auch war in sehr wenigen Fällen eine normale Zellmorphologie mit Filopodien zu beobachten, obwohl die *de novo* amyloiden Proteine

präsent waren (Daten nach drei Tagen, nicht gezeigt). Daraufhin wurden die Experimente wiederholt, diesmal jedoch weniger DNS für die Elektroporation der amyloiden Proteine eingesetzt und die Zellen bereits nach einem Tag für die Mikroskopie fixiert und gefärbt.

Auch einen Tag nach Elektroporation war zum einen der Anstieg des Hsp110 in den entsprechend mit Hsp110 und *de novo* Proteinen transfizierten Zellen sichtbar (Daten nicht gezeigt), zum anderen waren die Expressionslevel der *de novo* Proteine etwas höher als nach drei Tagen. Nach nur einem Tag Expression der *de novo* Proteine lagen mehr Zellen vor, welche Hsp110 und *de novo* amyloide Proteine überexprimierten und dabei eine normale Zellmorphologie beibehielten sowie keine Aggregate oder nur diffuse Anhäufungen zeigten (s. Abb. 4.65). Ohne eine Hsp110 Überexpression zeigten die *de novo* amyloiden Proteine die gewohnte partielle Colokalisation mit dem endogen codierten Hsp110, Aggregate waren in allen Fällen vorhanden und die Zellmorphologie war fast immer pathologisch verändert.

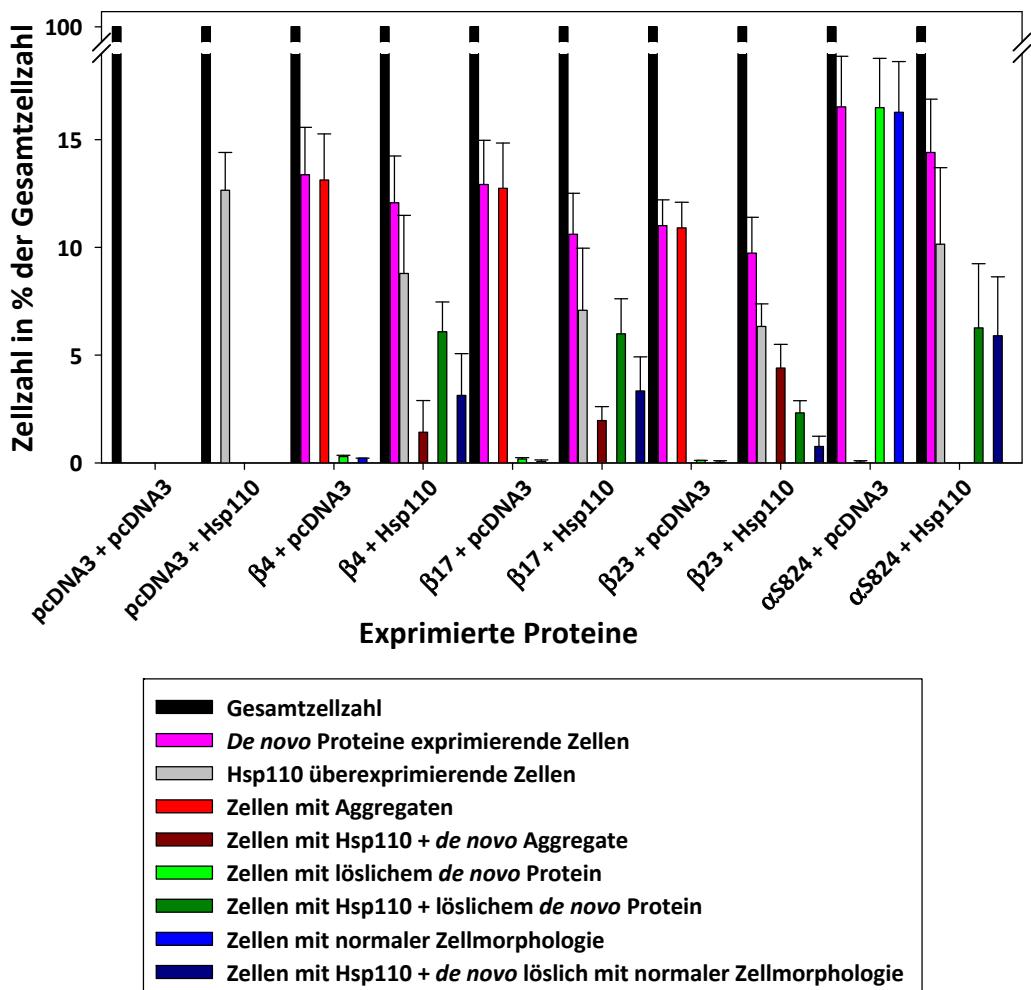


**Abb. 4.65: Coexpression von Hsp110 und *de novo* amyloiden Proteinen kann Aggregatbildung der amyloiden Proteine partiell verhindern und eine normale Zellmorphologie erhalten.**

HEK293T-Zellen wurden zuerst mit Hsp110 lipofiziert. 24 h später wurden die mit Hsp110 und Kontrollvektor transfizierten Zellen mit *de novo* Proteinen durch Elektroporation transfiziert. Nach Permeabilisierung erfolgten sukzessive die einzelnen Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern, wobei die Reihenfolge mit  $\alpha$ -Hsp110 (monoklonal aus der Maus),  $\alpha$ -Maus-FITC und schließlich  $\alpha$ -Myc-Cy3 stets eingehalten wurde, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Beim letzten Inkubationsschritt wurde zudem DAPI zur Lokalisierung des Nukleus zugesetzt. Nach Einbetten in Mounting-Medium erfolgte die Aufnahme der Bilder mit dem konfokalen Mikroskop von Leica, Ölimmersionsobjektiv 63x. Es wurden für jede Möglichkeit (Zellmorphologie/Homogenität der *de novo* Proteine) mit oder ohne überexprimierte Hsp110 Beispiele dargestellt.

Mit Hsp110 Überexpression gab es Fälle, wo die Zellmorphologie mit exprimierten *de novo* amyloiden Proteinen gänzlich der Kontrolle entsprach (z.B. in dieser Abb. 4.65  $\beta$ 17 mit Hsp110), und die Aggregate verschwunden waren, oder die Aggregate nicht auftraten, die Zellmorphologie nach

wie vor pathologisch war (z.B. Abb 4.65  $\beta$ 4 mit Hsp110). Dies war jedoch nicht immer der Fall, es gab auch Ereignisse mit stark überexprimiertem Hsp110 zusammen mit *de novo* amyloiden Proteinen, bei welchen weiterhin Aggregate auftraten (z.B. Abb. 4.65  $\beta$ 23 mit Hsp110). Auch zeichnete sich der Trend ab, dass sich  $\beta$ 23 resistenter als  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 gegen den Einfluss von Hsp110 verhielt (mehr Aggregate blieben erhalten, Zellmorphologie nach wie vor pathologisch), was mit den Ergebnissen des MTT-Tests (Abb. 4.64) kongruent ist. Um diese qualitativen Aussagen in Zahlen zu kleiden, wurden die Ereignisse klassifiziert und gezählt.



**Abb. 4.66: Überexpression von Hsp110 verhindert partiell die Bildung von Aggregaten der *de novo* Proteine und erhält die normale Zellmorphologie.** HEK293T-Zellen wurden zuerst mit Hsp110 lipofiziert. 24 h später wurden die mit Hsp110 und Kontrollvektor transfizierten Zellen mit *de novo* Proteinen mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Nach Permeabilisierung erfolgten sukzessive die einzelnen Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern (s. Abb. 4.65). Die Zellen wurden in die Klassen der Legende eingeteilt (mit und ohne Hsp110) und entsprechend gezählt. Die Gesamtzellzahl, die pro Experiment und Transfektion minimal ausgezählt wurde, betrug 900. Hierauf wurden pro Transfektion alle ausgezählten Werte normiert. Hsp110 wurde nur als positiv überexprimiert gewertet, wenn die Intensität in einer Zelle mindestens das dreifache des Hintergrundes an endogenem Hsp110 aufwies.

Das Diagramm der Abb. 4.66 verdeutlicht die Unterschiede zwischen mit *de novo* Proteinen und Hsp110 cotransfizierten Zellen sowie Zellen, welche nur *de novo* Proteine

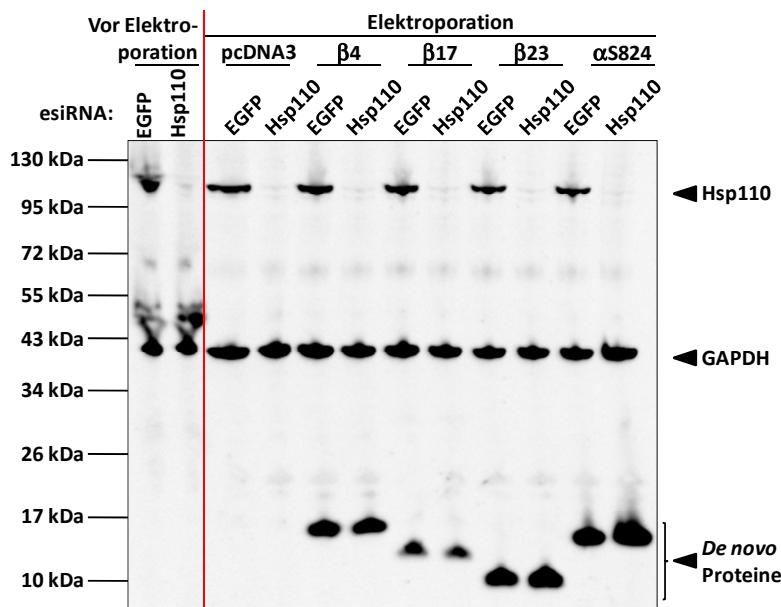
überexprimierten. Es wurde, wie erwartet, eine geringe Transfektionseffizienz mit den *de novo* Proteinen erhalten (16,5 % für  $\alpha$ S824 > 13,4 % für  $\beta$ 4 > 12,9 % für  $\beta$ 17 und > 11,0 % für  $\beta$ 23), da nur mit 5 µg Plasmid pro Elektroporation transfiziert wurde. Für Hsp110 lag die Transfektionseffizienz in ähnlichem Bereich. Waren die *de novo* amyloiden Proteine alleine überexprimiert, so zeigten sie in nahezu 100 % der Fälle klar voneinander abgegrenzte Aggregate, welche auch mit endogen codiertem Hsp110 colokalisierten. War Hsp110 überexprimiert, so änderte sich das Verhältnis von Aggregaten zu löslichem Material: In den cotransfizierten Zellen zeigten  $\beta$ 4 in 6,1 %,  $\beta$ 17 in 6,0 % und  $\beta$ 23 in 2,3 % aller Fälle lösliches Material, weniger Aggregate waren gebildet. Darüberhinaus zeigte eine Fraktion (ca. 3 %) von cotransfizierten Zellen eine normale Zellmorphologie, obwohl sie *de novo* amyloide Proteine überexprimierten.

Auf Grund der geringen Prozentsätze wurden pro Transfektion (zehn pro Experiment, dreimal unabhängig voneinander durchgeführt) mindestens 900 Zellen ausgezählt, um genügend Ereignisse zu erfassen.

Überexprimierte präexistente Hsp110 war somit in der Lage, die Zellviabilität von *de novo* amyloiden Proteinen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 exprimierenden Zellen zu erhöhen, eine normale Zellmorphologie aufrecht zu erhalten und Aggregatbildung zu supprimieren.

#### **4.1.30 Verminderte Expression von Hsp110 ändert die Zellviabilität der mit *de novo* amyloiden Proteinen transfizierten Zellen nicht**

Nach den obigen Ergebnissen wäre zu erwarten gewesen, dass eine verminderte Expression von Hsp110 zu einer vermehrten Toxizität der *de novo* amyloiden Proteine führen würde. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden HEK293T-Zellen zuerst mit esiRNS gegen Hsp110 transfiziert, um dann nach Transfektion der *de novo* Proteine die resultierende Zytotoxizität zu testen. Die esiRNS gegen Hsp110 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. F. Buchholz (Dresden) zur Verfügung gestellt. Abb. 4.67 zeigt, dass der Einsatz der esiRNS gegen Hsp110 sehr erfolgreich war. Die Synthese des endogenen Hsp110 wurde zu fast 100 % unterdrückt, dies war sowohl drei Tage nach der reversen Transfektion erkennbar (Aliquots: vor Elektroporation) und auch sechs Tage danach, als die *de novo* Proteine bereits drei Tage lang exprimiert worden waren. Die GAPDH-Mengen, sowie die Mengen der einzelnen *de novo* Proteine untereinander hatten sich durch die Suppression der Hsp110-Expression nicht geändert.

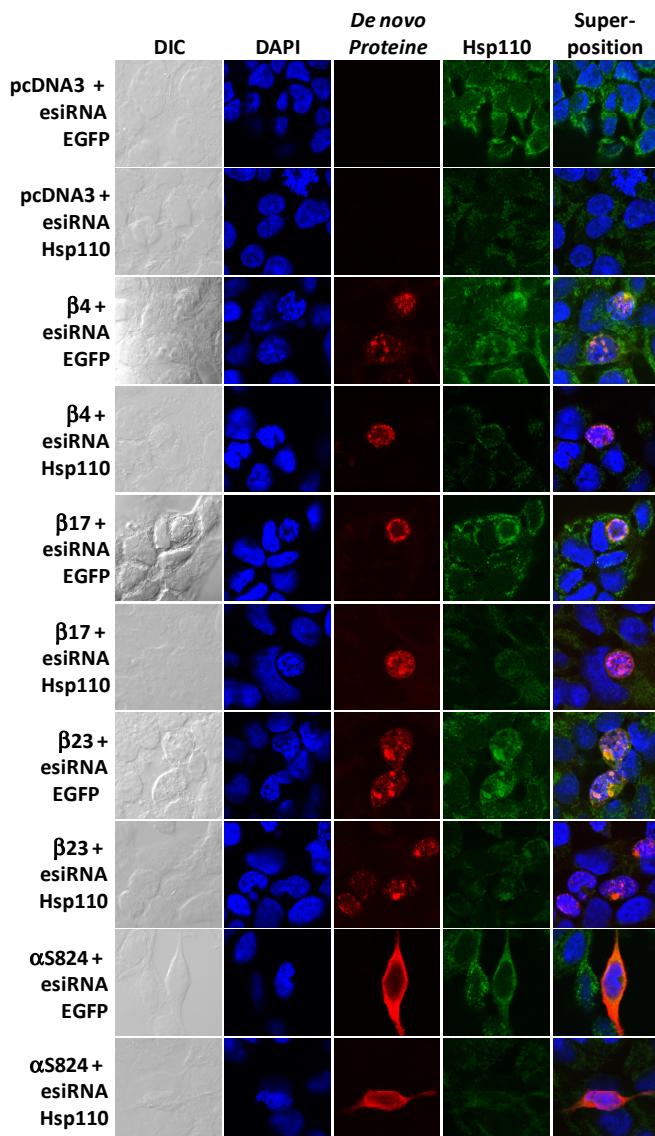


**Abb. 4.67:** Die Synthese von endogenem Hsp110 wird fast zu 100 % durch esiRNAs gegen Hsp110 supprimiert.

HEK293T-Zellen wurden nach reverser Methode mit Hsp110 esiRNAs transfiziert und drei Tage später *via* Elektroporation mit den *de novo* Proteinen transfiziert (Aliquot: Vor Elektroporation). Wiederum drei Tage später wurden die Zellen MTT-Tests unterzogen bzw. parallel Aliquots der Zellen für den hier gezeigten Western Blot lysiert. Aufgrund der verschiedenen Größe der Proteine Hsp110, GAPDH und *de novo* Proteine war es möglich, den Blot gleichzeitig mit  $\alpha$ -Hsp110,  $\alpha$ -GAPDH und  $\alpha$ -Myc zu dekorieren.

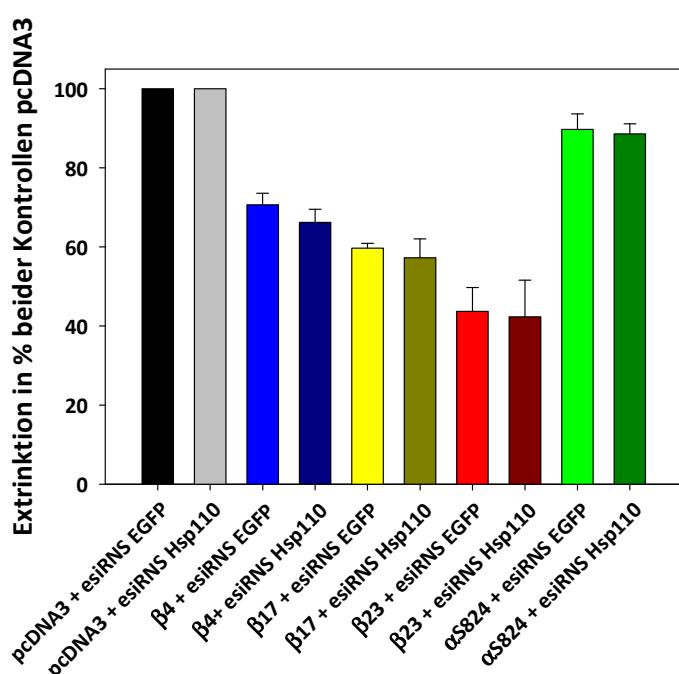
Auch auf zellbiologischer Ebene wurde die erfolgreiche Suppression von Hsp110 mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (s. Abb. 4.68). In nahezu allen Zellen fand sich eine deutlich erniedrigte Menge an Hsp110. Damit werden offenbar durch die Methode nicht nur mehr Zellen als durch normale Transfektion mit DNS-Vektoren in Lipofektion erreicht, auch scheint die Effizienz der Suppression sehr hoch zu sein. In nicht mit Hsp110-esiRNAs behandelten Zellen konnte wiederum eine Colokalisation zwischen den *de novo* amyloiden Aggregaten und Hsp110 festgestellt werden, während in den mit Hsp110-esiRNAs behandelten Zellen keine Colokalisation festgestellt werden konnte, wahrscheinlich aufgrund des in wesentlich geringerer Menge vorhandenen Hsp110. Die Morphologie der Zellen schien sich nach Zugabe von Hsp110-esiRNAs nicht geändert zu haben, weder in den mit der esiRNAs allein transfizierten Zellen (normale Morphologie) noch in den mit *de novo* Proteinen cotransfizierten Zellen. Die Abbildung verdeutlicht zudem, dass sich die Morphologie der mit *de novo* Proteinen transfizierten Zellen nicht verändert hatte (abgerundet, keine Filopodien;  $\alpha$ S824 mit und ohne Hsp110-esiRNAs zeigte normale Morphologie) und die Aggregate nach wie vor vorhanden waren. Eine Änderung an Form oder Anzahl konnte nicht ermittelt werden.

Parallel zur biochemischen und zellbiologischen Charakterisierung der mit esiRNAs-Hsp110 behandelten Zellen wurde auch die Toxizität mit Hilfe des MTT-Tests gemessen. Obwohl das endogene Hsp110 fast quantitativ durch die esiRNAs gegen Hsp110 aus den Zellen eliminiert worden war (s. Abb. 4.67), zeigten die mit den *de novo* amyloiden Proteine transfizierten und mit esiRNAs behandelten Zellen keine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität.



**Abb. 4.68: Die erfolgreiche Suppression der Hsp110-Synthese führt zu keiner Veränderung der Aggregatbildung und Zellmorphologie.**

HEK293T-Zellen wurden auf mit Hsp110-esiRNAs revers transzisiert und auf Deckgläsern ausgesät. Drei Tage später wurden sie mit *de novo* Proteinen via Elektroporation transzisiert und wiederum drei Tage später fixiert, permeabilisiert und mit entsprechenden Antikörpern gegen Hsp110 und  $\alpha$ -Myc-Cy3 dekoriert. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop von Leica mit einem Ölimmersionsoberflächenobjektiv von 63x gemacht.



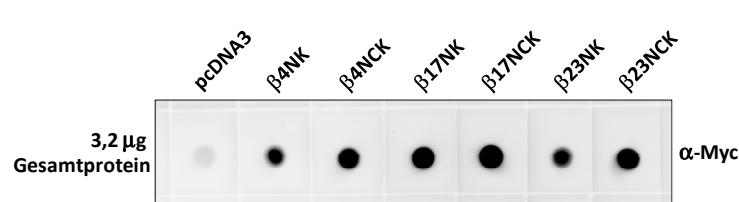
**Abb. 4.69: Suppression der Hsp110-Expression führt zu keiner signifikant erhöhten Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine.**

HEK293T-Zellen wurden nach reverser Methode mit Hsp110-esiRNAs transzisiert und drei Tage später *via* Elektroporation mit den *de novo* Proteinen transzisiert. Wiederum drei Tage später wurden die Zellen MTT-Tests unterzogen bzw. parallel Aliquots der Zellen für den in Abb. 4.67 gezeigten Western Blot lysiert.

Die MTT-Tests wurden dreimal unabhängig voneinander in Duplikaten mit je 125.000 ausgesäten Zellen pro Well durchgeführt.

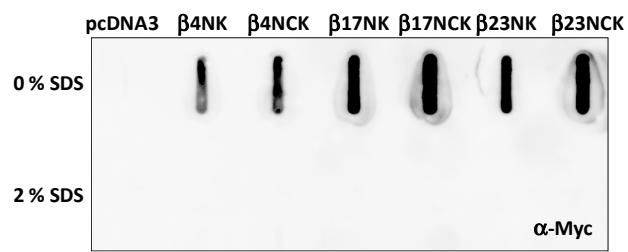
### 4.1.31 Punktmutationen verändern Zytotoxizität und Aggregation der *de novo* amyloiden Proteine nicht

Es wurde bereits in einer *in vitro*-Studie berichtet (Wang et al., 2002), dass die Aggregationsfähigkeit der *de novo* amyloiden Proteine abnimmt, wenn im ersten und letzten  $\beta$ -Strang der mittlere (4.) hydrophobe Rest durch ein hydrophiles Lysin ersetzt wird. Hier wurden die solcherart modifizierten Proteine mit der Bezeichnung –NK versehen, sofern es sich um N-terminale Modifikationen handelte oder –NCK, wenn sowohl am N- als auch am C-Terminus der mittlere hydrophobe Rest des jeweiligen  $\beta$ -Stranges durch Lysin substituiert wurde (s. auch Einleitung 2.6.1, Ergebnisse Abb. 4.1 und Anhang 8.6 Anhang F).



wurden auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht. Detektiert wurden die *de novo* Proteine mit dem  $\alpha$ -Myc-Ak.

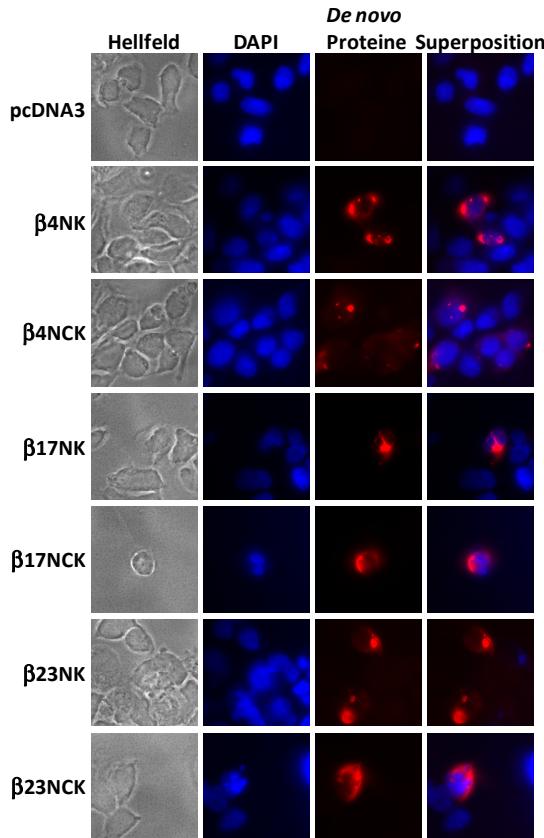
Diese Resultate konnten in dem hier angewendeten *in vivo*-System nicht nachvollzogen werden.



**Abb. 4.71:** *De novo*  $\beta$ -Faltblatt Proteine mit Lysin-Substitutionen werden im Zelluloseacetat-Filter retardiert.

Zellen wurden 24 h nach Transfektion unter nativen Bedingungen lysiert, die Proteinkonzentration bestimmt und 300  $\mu$ g Gesamtprotein wurden ohne SDS oder in Anwesenheit von 2 % SDS filtriert. Detektiert wurde die *de novo* Proteine mit  $\alpha$ -Myc-Ak.

Wie in Abb. 4.70 gezeigt, wurden die modifizierten Proteine exprimiert und alle im Filter retardiert (Abb. 4.71). Die exprimierte Menge der modifizierten  $\beta$ -Faltblattproteine entsprach derjenigen, welche im Filter retardiert wurde. In Abb. 4.72 ist die Immunfluoreszenz der *de novo* Lysin-substituierten Proteine dargestellt. Es wird deutlich, dass auch die modifizierten Versionen aggregieren, doch scheinen manche Aggregate größer als bei den Originalproteinen zu sein ( $\beta$ 17NK oder  $\beta$ 23NK) und manche auch etwas diffuser verteilt ( $\beta$ 23NCK). Das Verhalten im Filterretardationstest demonstriert jedoch, dass die überwiegende Neigung zur Aggregation auch bei diesen modifizierten Versionen erhalten geblieben ist. Abb. 4.73 zeigt die Zytotoxizität der originalen *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine und der Lysin-substituierten *de novo* Proteine.

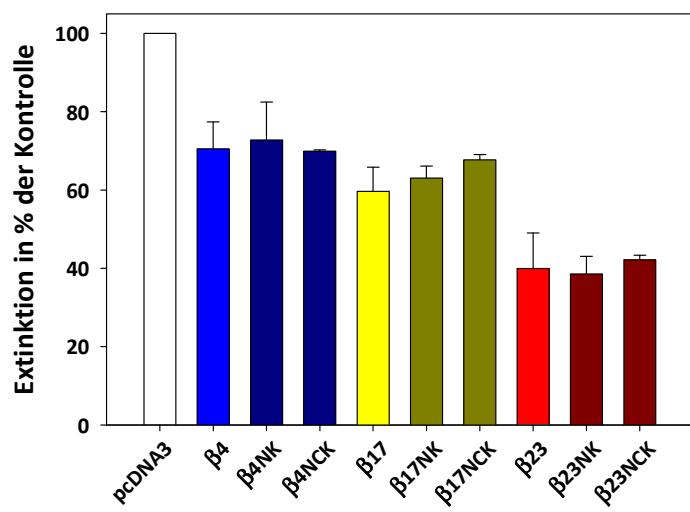


**Abb. 4.72:** Modifizierte *de novo* Proteine mit Lysin-Substitutionen im ersten und letzten  $\beta$ -Strang bilden ebenfalls Aggregate bzw. Aggregat-ähnliche Strukturen.

HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit *de novo* Proteinen  $\beta$ 4NK,  $\beta$ 4NCK,  $\beta$ 17NK,  $\beta$ 17NCK,  $\beta$ 23NK und  $\beta$ 23NCK mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit einem  $\alpha$ -Myc-Ak behandelt, welcher mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 konjugiert war. Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M und dem Ölimmersionsobjektiv 63 x gemacht.

Es traten nur geringe Unterschiede in der Zytotoxizität der Lysin-substituierten Proteine im Vergleich zu den originalen *de novo* Proteinen auf, die alle mit Ausnahme des Proteins  $\beta$ 17NCK im Bereich der Standardabweichungen liegen. Die oben beschriebenen Modifikationen der originalen *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine durch Lysin brachten

keine signifikanten Änderungen im Aggregationsverhalten oder der Zytotoxizität.

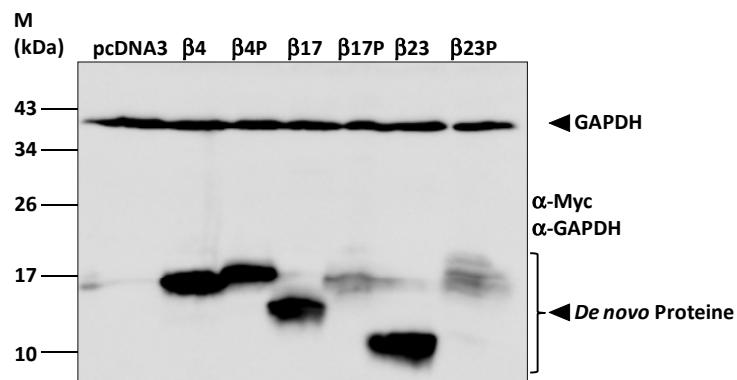


**Abb. 4.73:** Die Zytotoxizität der Lysin-substituierten *de novo* Proteine ändert sich im Vergleich zu den originalen *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen nicht.

HEK293T-Zellen wurden 72 h nach Transfektion ( $\beta$ 4,  $\beta$ 4NK,  $\beta$ 4NCK,  $\beta$ 17,  $\beta$ 16NK,  $\beta$ 17NCK,  $\beta$ 23,  $\beta$ 23NK,  $\beta$ 23NCK) mit MTT inkubiert, lysiert und die Extinktion gemessen. Die relativen Extinktionen in % der Kontrolle (Zellen transplantiert mit pcDNA3) korrelieren mit der Zytoviability.

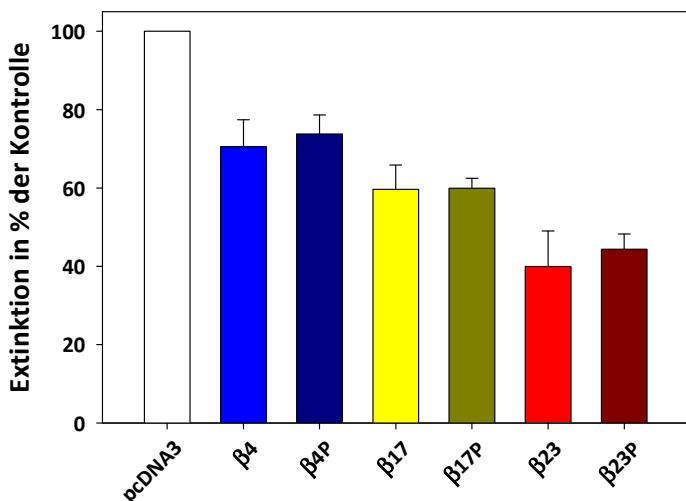
Eine andere Möglichkeit aggregierende Strukturen zu

modifizieren wurde in der Substitution von zwei Glycinresten im mittleren (dritten) Turn angenommen (s. Abb. 4.1 und 8.6 Anhang F).



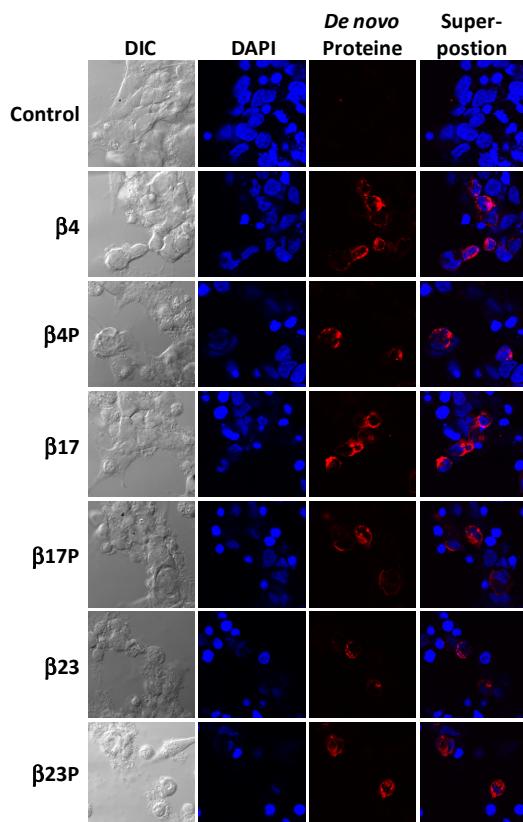
**Abb. 4.74:** *De novo* amyloide Proteine mit zwei Prolin-Substitutionen im mittleren Turn werden exprimiert, aber zeigen ein anderes Laufverhalten in der SDS-PAGE.

24 h nach Transfektion wurden die HEK293T-Zellen lysiert und gleiche Volumina des Lysats auf eine SDS-PAGE geladen. Auf dem nachfolgenden Western Blot wurden die *de novo* Proteine sowie das Kontrollprotein GAPDH simultan dargestellt.



**Abb. 4.75:** Die Zytotoxizität der Prolin-substituierten *de novo* Proteine ändert sich nicht im Vergleich zu den originalen *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen.

HEK293T-Zellen wurden 72 h nach Transfektion ( $\beta$ 4,  $\beta$ 4P,  $\beta$ 17,  $\beta$ 17P,  $\beta$ 23,  $\beta$ 23P) mit MTT inkubiert, eine Stunde später lysiert und die Extinktion gemessen. Die relativen Extinktionen in % der Kontrolle (Zellen transfiziert mit pcDNA3) korrelieren mit der Zytoviability.



**Abb. 4.76:** Immunfluoreszenz-Abbildungen legen dar, dass die Prolin-substituierten *de novo* Proteine in gleicher Weise Aggregate wie die originalen *de novo* amyloiden Proteine bilden.

HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten fixiert, permeabilisiert und mit  $\alpha$ -Myc-Cy3 inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop von Leica mit einem 63 x Olimmersionsobjektiv gemacht.

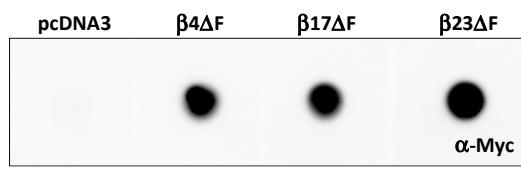
Aus Abb. 4.74 geht hervor, dass die Prolin-substituierten *de novo* Proteine exprimiert wurden, jedoch traten deutliche Unterschiede zu den ursprünglichen Proteinen auf.  $\beta$ 17P und  $\beta$ 23P wurden geringer exprimiert als die ursprünglichen *de novo* Proteine  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23, zudem wiesen sie eine höhere apparente Molmasse auf als die originalen Proteine.

Die indirekten Immunfluoreszenz-Bilder (Abb. 4.76) zeigen, dass die Prolin-substituierten *de novo* Proteine ähnliche Aggregate wie die originalen *de novo*  $\beta$ -Faltblatt-Proteine bildeten. Auch die Zellmorphologie scheint derjenigen, der mit den originalen Proteinen transfizierten Zellen, gleich zu sein: Die Zellen zeigten keinerlei Filopodien, das Verhältnis Zytoplasma/Nukleus war verkleinert und die Form war allgemein sphäroidisch. Auch hier veränderte sich die Zytotoxizitäten der Prolin-substituierten *de novo* Proteine gegenüber den originalen *de novo* Proteine nicht, wie in Abb. 4.75 dargestellt.

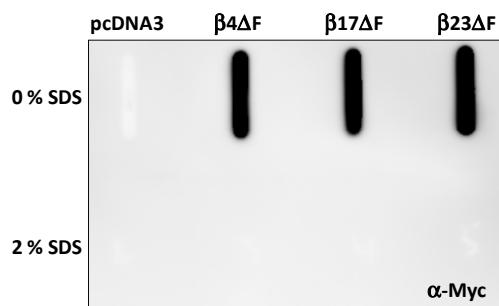
Zusammenfassend zeigen diese Resultate, dass die hier verwendeten Konstrukte mit Punktmutationen keine wesentlichen Änderungen in Zytotoxizität und Aggregationsverhalten im Vergleich zu den *de novo* amyloiden Ausgangsproteinen herbeiführten.

#### 4.1.32 Um den letzten $\beta$ -Strang deletierte oder extendierte *de novo* amyloide Proteine weisen eine erhöhte Zytotoxizität auf

Die um das letzte (6.)  $\beta$ -Faltblatt, mit „F“ bezeichnet, deletierten Versionen wurden entsprechend als  $\beta4\Delta F$ ,  $\beta17\Delta F$  und  $\beta23\Delta F$  benannt.

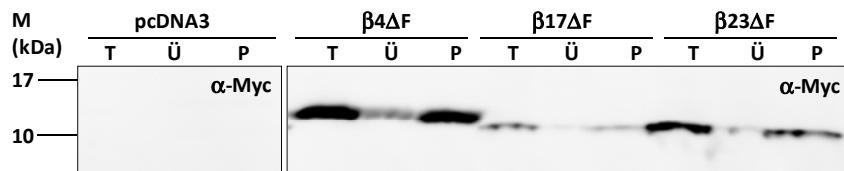


**Abb. 4.77: Deletierte Modifikationen der *de novo* amyloiden Proteine werden exprimiert.** 24 h nach Transfektion wurden die *de novo* Proteine exprimierenden HEK293T-Zellen unter nativen Bedingungen lysiert und 3,2  $\mu$ g Gesamtprotein wurden auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht.



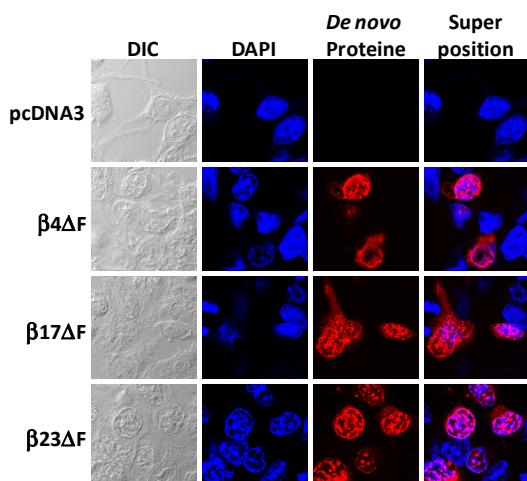
**Abb. 4.78: Deletierte *de novo* amyloiden Proteine werden im Filter mit 0,2  $\mu$ m Porenweite retardiert.** Zellen wurden 24 h nach Transfektion unter nativen Bedingungen lysiert, die Proteinkonzentration bestimmt und 400  $\mu$ g Gesamtprotein wurden ohne SDS oder in Anwesenheit von 2 % SDS filtriert. Detektiert wurde die *de novo* Proteine mit  $\alpha$ -Myc-Ak.

Diese verkürzten Proteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert (Abb. 4.77) und ebenfalls im Filter retardiert (Abb. 4.78), ein Befund, welcher mit derjenigen der Ultrazentrifugation (Abb. 4.79) und der mikroskopischen Bilder (Abb. 4.80) korrelierte. Abb. 4.79 zeigt den Anteil der verkürzten *de novo* Proteine, welche sich im Überstand ( $\ddot{U}$ ) und Pellet (P) befinden. Auch hier ist das Verhältnis von Pellet zu Überstand größer als 1, was wie im Falle der ursprünglichen *de novo* Proteine demonstriert, dass diese Proteine größtenteils unlöslich sind und Aggregate bilden.



nativen Bedingungen wurden 30 µg jeder Probe bei 100.000 g zentrifugiert. Gleiche Volumina an Gesamtprotein (T), Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden aufgetragen und *via* Western Blot analysiert.

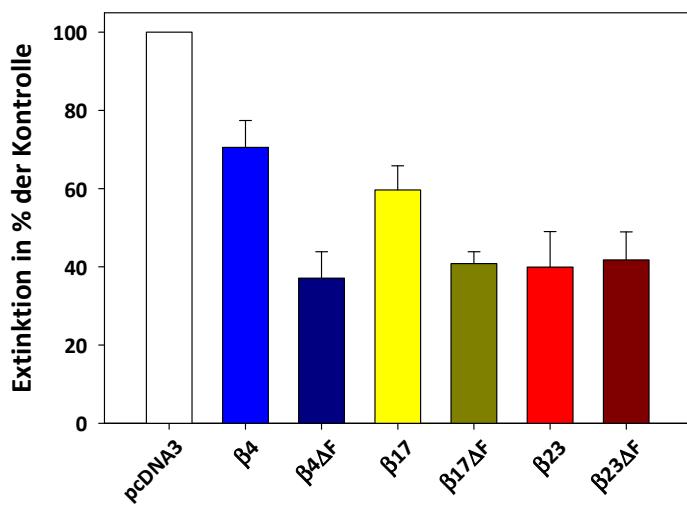
Die Aggregatbildung wird auch in Abb. 4.80 durch die mikroskopischen Bilder untermauert. Sie verdeutlicht zudem, dass die Zellmorphologie gestört war, was die Abrundung und das Fehlen von Filopodien demonstriert.



**Abb. 4.80: Deletierte *de novo* Proteine bilden Aggregate in HEK293T-Zellen.** HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten fixiert, permeabilisiert und mit  $\alpha$ -Myc-Cy3 inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop von Leica mit einem 63 x Ölimmersionsobjektiv gemacht.

Ein Unterschied zu den ursprünglichen *de novo* Proteinen fällt jedoch auf: Mehr exprimiertes Material wurde anscheinend in den Nukleus transloziert, dies galt gleichermaßen für alle deletierten Proteine. Eine Colokalisation mit den

Substrukturen des Nukleus bestand jedoch nicht oder nur zufälligerweise an einigen Positionen.



**Abb. 4.81: Um einen  $\beta$ -Strang deletierte *de novo* Proteine  $\beta_4\Delta F$  und  $\beta_{17}\Delta F$  weisen eine höhere Zytotoxizität auf als ihre *de novo* originalen Proteine.**

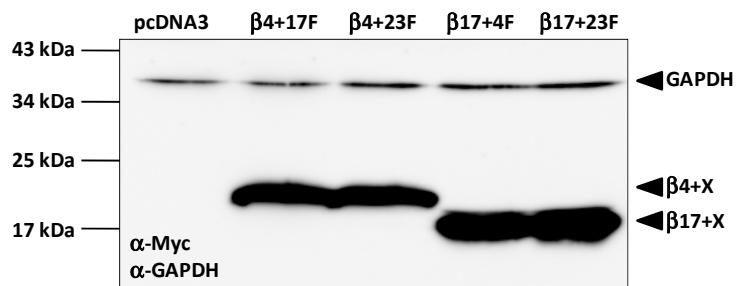
HEK293T-Zellen wurden 72 h nach Transfektion ( $\beta_4$ ,  $\beta_4\Delta F$ ,  $\beta_{17}$ ,  $\beta_{17}\Delta F$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{23}\Delta F$ ) mit MTT inkubiert, eine Stunde später lysiert und die Extinktion gemessen. Die relativen Extinktionen in % der Kontrolle (Zellen transfiziert mit pcDNA3) korrelieren mit der Zytoviability.

MTT-Tests wiesen eine auffällige Erhöhung der Zytotoxizität der deletierten Versionen der  $\beta$ -

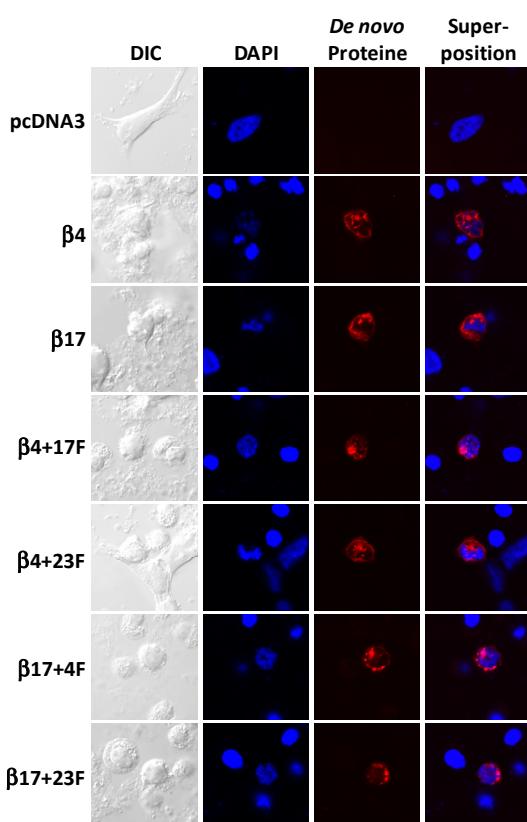
Faltblattproteine nach, dies galt für die Proteine  $\beta_4\Delta F$  und  $\beta_{17}\Delta F$ , jedoch nicht für  $\beta_{23}\Delta F$ . Niedrigere Zellviabilitätswerte als 32 % in einzelnen Messungen wurden in diesem System nicht erreicht. Dies könnte mit der Transfektionseffizienz der Elektroporationsmethode

korrelieren (es war nicht möglich mit Elektroporation mehr als 68 % der Zellen zu transzitieren, s. auch Diskussion).

Es stellte sich die Frage, welche Auswirkungen es haben würde, wenn die originalen *de novo*  $\beta$ -Proteine  $\beta 4$  und  $\beta 17$  um einen zusätzlichen Turn und einen  $\beta$ -Strang verlängert wären (s. Abb. 4.1 und 8.6 Anhang F).



**Abb. 4.82:** *De novo* extendierte  $\beta$ -Faltblattproteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert.  
HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden codierend für die extendierten *de novo* Proteine transfiziert, nach 24 h lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE im 15 %igen Gel und Western Blot analysiert.

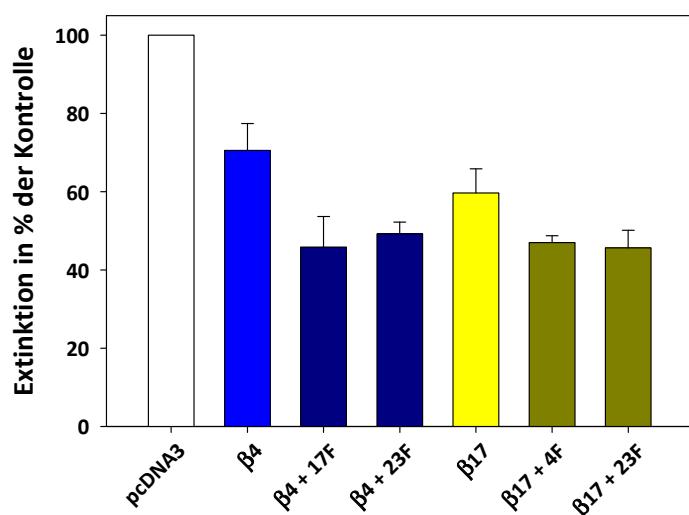


**Abb. 4.83:** *De novo* extendierte  $\beta$ -Faltblattproteine aggregieren und führen zu einer veränderten Zellmorphologie.

HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten fixiert, permeabilisiert und mit  $\alpha$ -Myc-Cy3 inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop von Leica mit einem 63x Olimmersionsobjektiv gemacht.

Die expandierten *de novo* Proteine wurden exprimiert und zeigten eine höhere apparente Molmasse als die *de novo* ursprünglichen amyloiden Proteine (s. Abb. 4.82). Ebenso wie bei den ursprünglichen *de novo* Proteinen wurde eine veränderte Zellmorphologie beobachtet, nämlich das Fehlen von Filopodien und Fragmentierungen des Nukleus. Auch hier konnten Colokalisationen der *de novo* Proteine mit dem Nukleus nachgewiesen werden. Die

Zytotoxizitätsmessung *via* MTT-Test nach drei Tagen ergab für alle vier extendierten Proteine eine Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber den ursprünglichen *de novo*  $\beta$ -Faltblatt-Proteinen (s. Abb. 4.84).



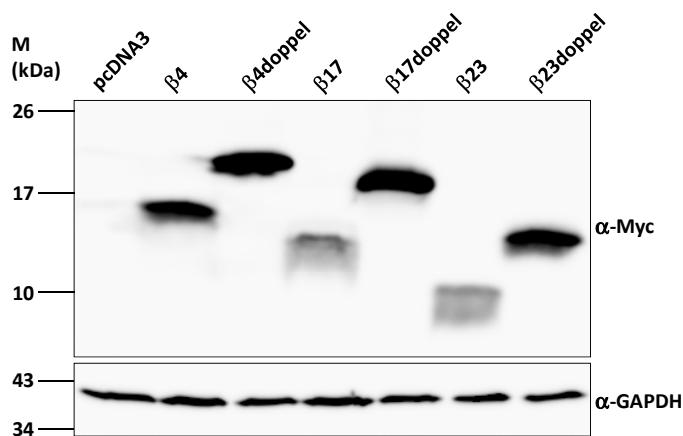
**Abb. 4.84:** Extendierte Versionen der *de novo* Proteine  $\beta_4$  und  $\beta_{23}$  sind für HEK293T-Zellen toxischer als die unmodifizierten Konstrukte.

HEK293T-Zellen wurden 72 h nach Transfektion ( $\beta_4$ ,  $\beta_4 + 17F$ ,  $\beta_4 + 23F$ ,  $\beta_{17}$ ,  $\beta_{17} + 4F$  und  $\beta_{17} + 23F$ ) mit MTT inkubiert, eine Stunde später lysiert und die resultierende Extinktion gemessen. Die relativen Extinktionen in % der Kontrolle (Zellen transfiziert mit pcDNA3) korrelieren mit der Zytovialität.

Zusammengenommen weisen die modifizierten *de novo* amyloiden Proteine mit einer ungeraden Anzahl an  $\beta$ -Faltblättern eine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu den Ausgangsproteinen  $\beta_4$  und  $\beta_{17}$  auf.

#### 4.1.33 Verdoppelte Versionen der *de novo* $\beta$ -amyloiden Proteine zeigen eine intermediäre Zytotoxizität zwischen den verkürzten/extendierten und den originalen *de novo* amyloiden Proteinen

Da die um einen  $\beta$ -Strang verlängerten oder verkürzten Versionen in beiden Fällen eine erhöhte Zytotoxizität aufwiesen, stellte sich die Frage, ob verlängerte Versionen mit einer geraden Anzahl von  $\beta$ -Strängen (12 im Falle der Doppel-Konstrukte) ebenfalls eine Erhöhung oder möglicherweise eine Erniedrigung der Toxizität mit sich brächten.

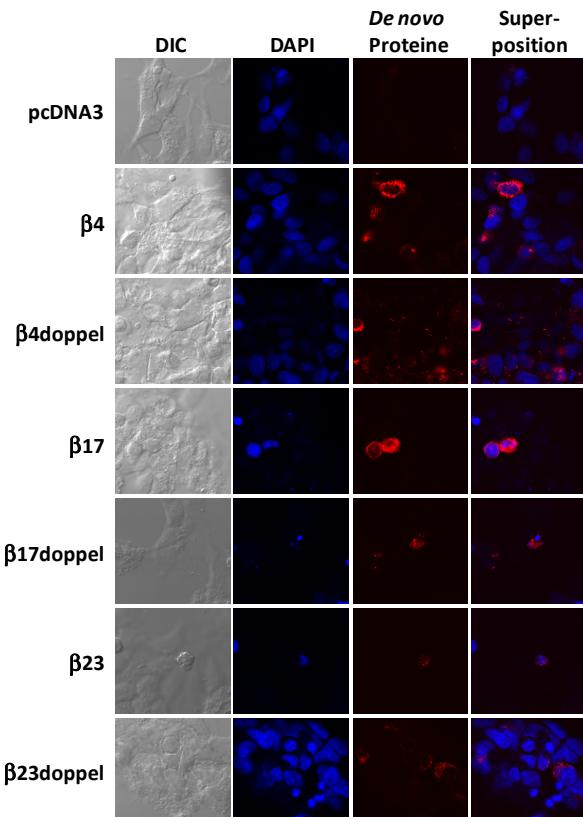


**Abb. 4.85:** Verdoppelte *de novo* Proteine werden in HEK293T-Zellen mit der erwarteten apparenten Molmasse exprimiert.

HEK293T-Zellen wurden mit 30  $\mu$ g Plasmiden, welche codierende Sequenzen der *de novo* Proteine enthalten, durch Elektroporation transfiziert und 24 h später in Gegenwart von  $\beta$ -ME lysiert. Die erhaltene Western Blot Membranen wurden mit  $\alpha$ -Myc und  $\alpha$ -GAPDH inkubiert.

Daher wurden die Sequenzen der ursprünglichen  $\beta$ -Faltblattproteine  $\beta_4$ ,  $\beta_{17}$  und  $\beta_{23}$  verdoppelt (s. Abb. 4.1 und 8.6 Anhang F), und diese verdoppelten *de novo* Proteine exprimiert, wobei wieder eine Abstufung ihrer apparenten Molmasse in einem 15 %igem PA-Gel sichtbar wurde.

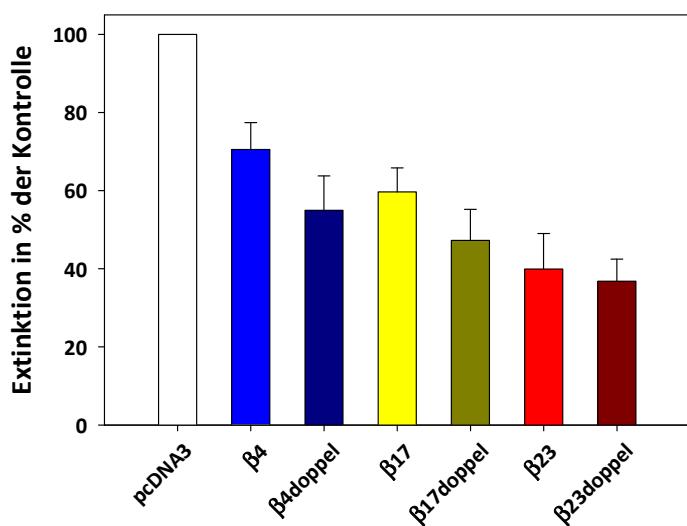
Obwohl theoretisch in etwa gleiche Molmassen von ca. 18 kDa zu erwarten waren, zeigte sich doch ein gänzlich anderes Wanderungsverhalten im Gel, was dem ihrer Ausgangskonstrukte entsprach, nur um ca. 10 kDa zur höheren Molmasse hin verschoben.



**Abb. 4.86: Verdoppelte *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine bilden Aggregate in HEK293T-Zellen.**

24 h nach Transfektion wurden die hier verwendeten HEK293T-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit einem  $\alpha$ -Myc Antikörper aus der Maus behandelt, welcher kovalent mit dem Fluorophor Cy3 konjugiert war, und für 1 h inkubiert. Die Bilder wurden mit Hilfe des Leica TCS SP2 konfokalen Laser-Scanning Mikroskops mit einem Ölilmersionsobjektiv der Vergrößerung 63x angefertigt.

Die exprimierten Mengen der Doppel-Konstrukte waren untereinander ähnlich, anders als bei den originalen *de novo* Proteinen, wo wieder die Unterschiede in ihrer Expressionsmenge deutlich wurden. Die verdoppelten Versionen der *de novo* Proteine aggregierten, jedoch schienen die Aggregate im Vergleich zu den originalen Proteinen im Schnitt etwas kleiner und kompakter zu sein.



**Abb. 4.87: Verdoppelte *de novo* Proteine  $\beta_4\text{doppel}$  und  $\beta_{17}\text{doppel}$  zeigen eine leicht erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu den originalen *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen.**

HEK293T-Zellen wurden 72 h nach Transfektion ( $\beta_4$ ,  $\beta_4\text{doppel}$ ,  $\beta_{17}$ ,  $\beta_{17}\text{doppel}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{23}\text{doppel}$ ) mit MTT inkubiert, eine Stunde später lysiert und die Extinktion gemessen. Die relativen Extinktionen in % der Kontrolle (Zellen transfiziert mit pcDNA3) korrelieren mit der Zytovialität.

Der MTT-Test (s. Abb. 4.87) wies eine erhöhte Zytotoxizität in HEK293T-Zellen nach, welche die verdoppelten Konstrukte  $\beta_4\text{doppel}$  und  $\beta_{17}\text{doppel}$  exprimierten. Die Zytotoxizität lag jedoch deutlich unter jener der um einen  $\beta$ -Strang deletierten bzw. extendierten Konstrukte.

#### 4.1.34 Die Chimäre aus $\alpha$ S824 und dem letzten $\beta$ -Strang aus $\beta$ 23 verteilt sich homogen in der Zelle, ist jedoch im Vergleich zu $\alpha$ S824 zytotoxischer

Da eine ungerade Anzahl an  $\beta$ -Strängen eines *de novo* Proteins anscheinend die Zytotoxizität erhöht (s. Ergebnisse 4.1.32), stellte sich die Frage, ob ein zusätzlicher  $\beta$ -Strang an ein  $\alpha$ -helikales Protein angefügt ebenfalls Auswirkungen auf dessen Löslichkeit, Expressionsmenge und Zytotoxizität besäße.

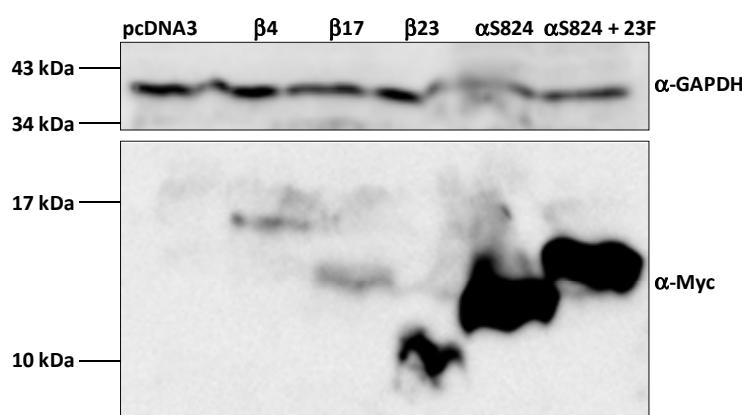


Abb. 4.88: Das chimäre Protein  $\alpha$ S824+23F wird in ähnlicher Menge wie das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ S824 exprimiert.

HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden codierend für die originalen *de novo* Proteine und die Chimäre  $\alpha$ S824+23F transfiziert, nach 24 h lysiert und die Proteine *via* SDS-PAGE im 15 %igen Gel und Western Blot analysiert. Die *de novo* Proteine wurden mit einem  $\alpha$ -Myc-Ak detektiert, das Kontrollprotein GAPDH mit dem entsprechenden Ak.

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Chimäre aus dem  $\alpha$ -helikalen Protein  $\alpha$ S824 und dem letzten  $\beta$ -Strang (F) aus dem *de novo*  $\beta$ -Faltblattprotein  $\beta$ 23 hergestellt (s. auch Abb. 4.1 und 8.6 Anhang F) und die Chimäre exprimiert (s. Abb. 4.88).

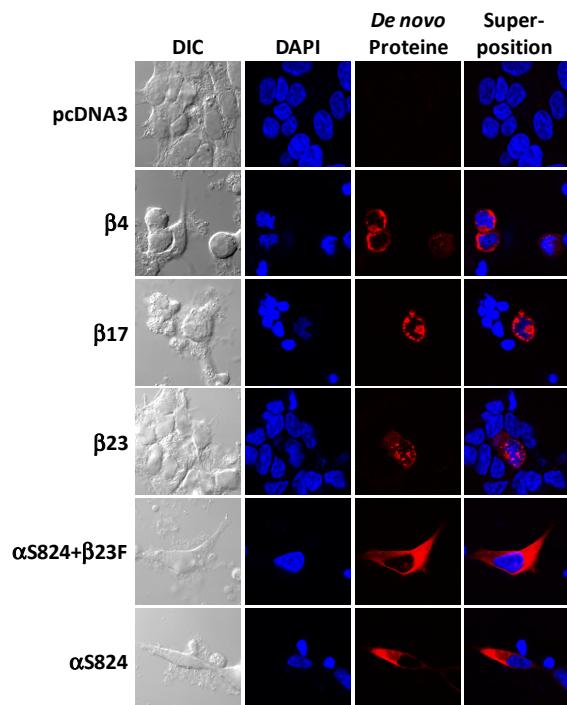


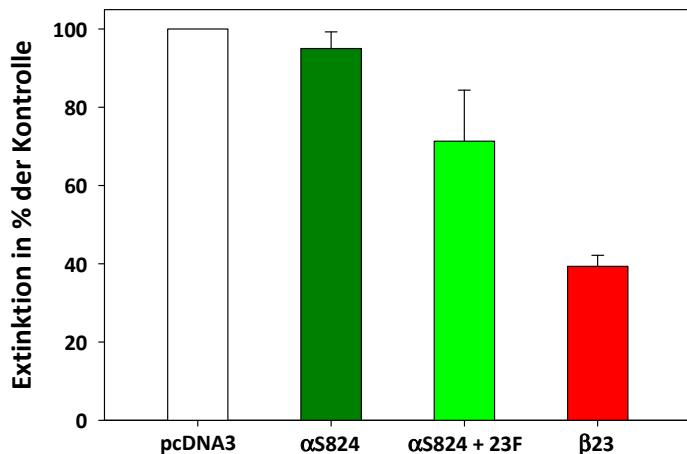
Abb. 4.89: Das chimäre *de novo* Protein  $\alpha$ S824+23F ist homogen über das Zytosplasma verteilt und ändert die Zellmorphologie nicht.

24 h nach Transfektion wurden die hier verwendeten HEK293T-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit einem  $\alpha$ -Myc Antikörper aus der Maus behandelt, welcher kovalent mit dem Fluorophor Cy3 konjugiert war, und für 1 h inkubiert. Die Bilder wurden mit Hilfe des Leica TCS SP2 konfokalen Laser-Scanning Mikroskops mit einem Ölimmersionsobjektiv der Vergrößerung 63x angefertigt.

Die mikroskopischen Bilder (Abb. 4.89) der Chimäre belegen eindeutig, dass das Protein homogen über die gesamte Zelle verteilt ist und sich in dieser Beziehung genauso wie das ursprüngliche  $\alpha$ S824 verhält. Auch entspricht die Zellmorphologie nach der Expression dieses Proteins derjenigen der Kontrolle (pcDNA3) bzw. der  $\alpha$ S824 exprimierenden Zellen.

Dagegen ergab die Zytotoxizitätsmessung im MTT-Test eine Erhöhung der Toxizität des

Proteins um ca. 20 % des  $\alpha$ S824+23F im Vergleich zum unmodifizierten  $\alpha$ S824. Diese Erhöhung der Toxizität geht also vom angefügten letzten  $\beta$ -Strang und Turn des Proteins  $\beta$ 23 aus.

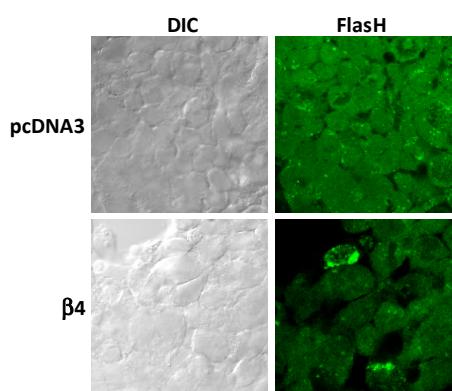


**Abb. 4.90:** Das *de novo* Protein  $\alpha$ S824+23F ist um ca. 20 % zytotoxischer für HEK293T-Zellen als das Ausgangsprotein  $\alpha$ S824.

HEK293T-Zellen wurden 72 h nach Transfektion ( $\alpha$ S824,  $\alpha$ S824+23F,  $\beta$ 23) mit MTT inkubiert, eine Stunde später lysiert und die Extinktion gemessen. Die relativen Extinktionen in % der Kontrolle (Zellen transfiziert mit pcDNA3) korrelieren mit der Zellviabilität.

#### 4.1.35 *De novo* amyloide Proteine mit C4-Tag weisen ähnliche Zytotoxizitäten wie mit Myc-konjugierte *de novo* amyloide Proteine auf

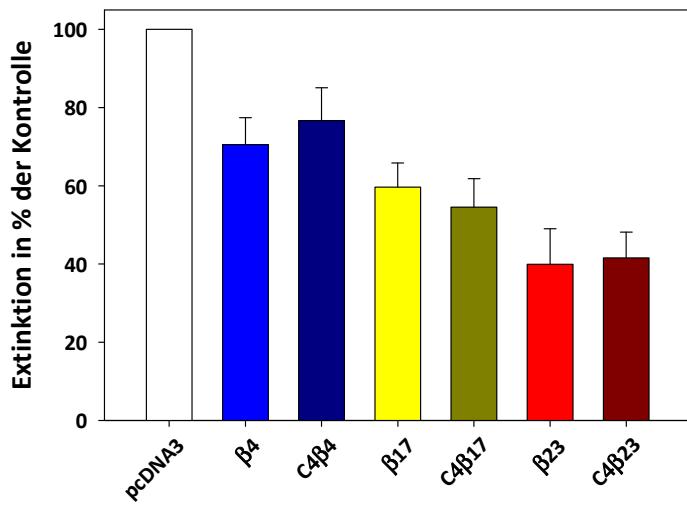
Um die *de novo* Proteine *in vivo* verfolgen zu können und zu prüfen, ob der Myc-Tag als solcher Einfluss auf die Zytotoxizität der *de novo* Proteine nimmt, wurde der N-terminale Myc-Tag durch einen Tetracystein-tag (C4-Tag) ersetzt (s. Abb. 4.1 und 8.6 Anhang F). Ein C4-Tag wurde deshalb gewählt, weil die *de novo* Proteine sehr klein sind und ein großer fluoreszierender Anhang wie z.B. GFP die Faltung, die Eigenschaften und damit die Auswirkungen auf die Zytotoxizität und eventuelle Interaktionspartner beeinträchtigen könnte.



**Abb. 4.91:** Das *de novo* Protein  $\beta$ 4 mit C4-Tag bindet FlasH und bildet Aggregate.

Lebende, unfixierte Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit FlasH und reduzierendem Reagenz EDT behandelt. Erst danach wurden die Zellen gewaschen, fixiert und mit Mounting-Medium eingebettet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Leica TCS SP2 konfokalen Laser-Scanning Mikroskops mit einem Ölimmersionsoptiv der Vergrößerung 63 x angefertigt. Exzitation: 593 nm, Emission: 608 nm.

Da kein Antikörper verfügbar war, um die Expression des C4-Tags in Zellen zu visualisieren, wurde versucht, die Expression mikroskopisch, nach Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes FlasH an den C4-Tag darzustellen, was in Abb. 4.91 exemplarisch nach Transfektion mit dem Protein  $\beta$ 4 gezeigt ist.



**Abb. 4.92:** Eine Substitution des Myc-Tags durch den C4-Tag ändert die Zytotoxizität der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine kaum.

HEK293T-Zellen wurden 72 h nach Transfektion ( $\beta_4$ ,  $C4\beta_4$ ,  $\beta_{17}$ ,  $C4\beta_{17}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $C4\beta_{23}$ ) mit MTT inkubiert, eine Stunde später lysiert und die Extinktion gemessen. Die relativen Extinktionen in % der Kontrolle (Zellen transfiziert mit pcDNA3) korrelieren mit der Zellviabilität.

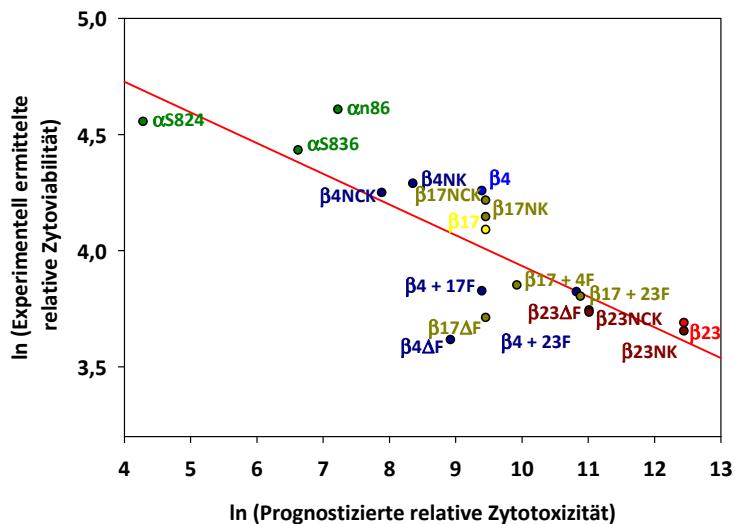
Es waren nach Transfektion mit dem *de novo* Protein  $\beta_4$  Aggregate oder Aggregat-ähnliche Strukturen im

Vergleich zur Kontrolle zu erkennen, auch hier schien die Zellmorphologie verändert zu sein.

Es gab Schwierigkeiten mit dem EDT-Reduktionsschritt, da dieses anders als in einigen Publikationen beschrieben (Ignatova und Giersch, 2004) selbst toxische Effekte hervorrief und zur Ablösung der semiadhärenten Zellen führte. Wie in Abb. 4.91 dargestellt, gab es deshalb starke Hintergrundprobleme, es konnte aber zumindest nachgewiesen werden, dass die Proteine exprimiert wurden. Die zytotoxischen Messungen ergaben, dass die Substitution des Myc-Tags durch den C4-Tag zu keiner deutlichen Änderung der Zytotoxizität führten, was bedeutet, dass auch die Gradierung der Zytotoxizität nach wie vor vorhanden war. Dies bedeutet auch, dass der Anhang als solcher keine großen Auswirkungen auf Aggregation und Zytotoxizität der Proteine aufwies und der Myc-Tag zur Detektion der Proteine *in vivo*, ohne die Eigenschaften der *de novo* Proteine in mammalischen Zellen zu sehr zu beeinträchtigen, beibehalten werden konnte.

#### 4.1.36 Experimentell ermittelte Zytotoxizität der *de novo* Proteine korreliert mit der *in silico* prognostizierten Zytotoxizität

Nachdem experimentell Zellviabilitätswerte mit Hilfe von MTT-Tests erhalten worden waren, wurden in Kooperation mit Dr. M. Vendruscolo und Dr. G. Tartaglia (Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Dobson, Cambridge, UK) prognostizierte Zytotoxizitäten mit diesen verglichen. Es wurde für die Berechnung der prognostizierten Zytotoxizitäten ein Programm namens Zyggregator eingesetzt (Tartaglia und Vendruscolo, 2008), welches Parameter wie Ladung, hydrophobe und hydrophile Aminosäuren, die Ionenstärke der umgebenden Lösung, den pH-Wert, die Konzentration der Proteine (hier nicht angegeben) und daraus die Aggregationswahrscheinlichkeit für die Vorhersage der Zytotoxizität verwendete.



**Abb. 4.93:** Die experimentell ermittelte und die mit dem Programm Zygggregator berechnete prognostizierte Zytotoxizität der *de novo* Proteine korrelieren miteinander (- 75 %). Der Logarithmus der experimentell ermittelten Daten der Zytoviability und der prognostizierten Daten der Zytotoxizität wurden gegeneinander aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die erhaltene Ausgleichsgerade zeigt die Korrelation zwischen den beiden Wertepaaren an.

Es ergab sich eine recht hohe Korrelation von – 75 %, welche

mit dem Programm Zygggregator berechnet wurde. Aus Abb. 4.93 geht hervor, dass  $\beta_{23}$  sowohl mit der prognostizierten als auch mit der experimentellen Methode die höchste Zytotoxizität aufwies, während  $\beta_4$  von den drei *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen bei beiden Größen die niedrigste zeigte. Die  $\alpha$ -helikalen Proteine legten, wie nach den Experimenten erwartet, bei der prognostizierten Zytoviability die höchsten Werte vor, wobei auch bei den prognostizierten Werten  $\alpha S824$  eine niedrigere theoretische Zytotoxizität aufwies als  $\alpha S836$ . Auch die Verlängerung der originalen *de novo* Proteine  $\beta_4$  und  $\beta_{17}$  führte insgesamt im theoretischen Modell zu einer Erhöhung der Zytotoxizität bzw. einer niedrigeren Zellviability, das gleiche galt auch für die deletierten Versionen. Abweichungen zwischen den experimentell ermittelten Daten und den prognostizierten Daten gab es vor allem bei den Lysin-substituierten Proteinen: Hier wurde für die doppelt substituierten Konstrukte eine niedrigere Zytotoxizität vorausgesagt als es der experimentell ermittelten entsprach.

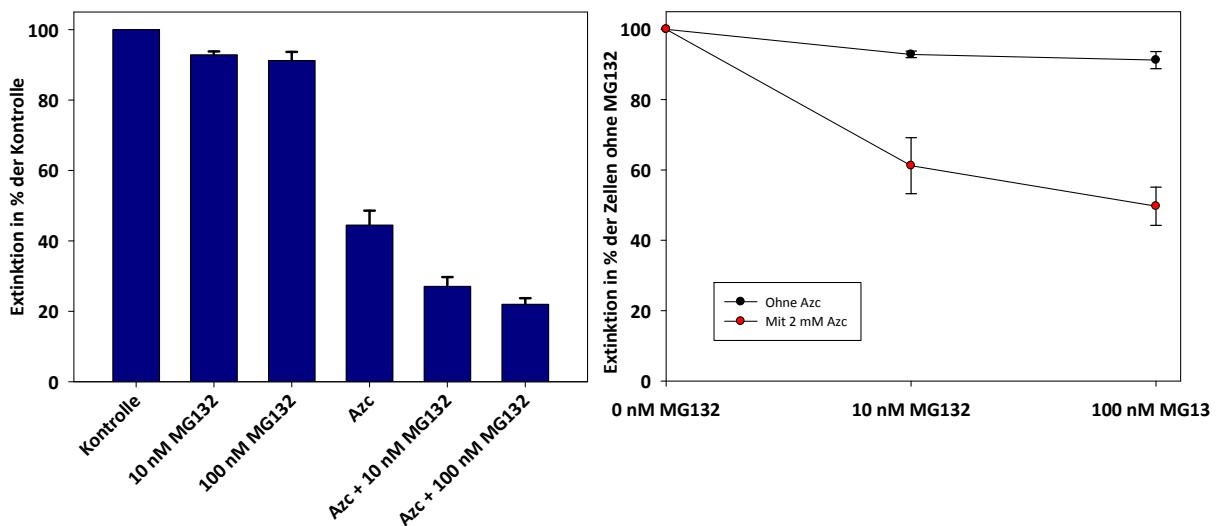
Insgesamt wurde eine gute Korrelation zwischen den experimentell ermittelten und den *in silico* prognostizierten Zytotoxizitäten erhalten.

## 4.2 Das Aminosäureanalogon Azc induziert durch Inkorporation in das Proteom die Bildung zytotoxischer, amyloider Proteinspezies

### 4.2.1 Die Zytotoxizität von Azc wird in Gegenwart des proteasomalen Inhibitors MG132 verstärkt

Die nicht-kanonische Aminosäure L-Azetidin-2-carbonsäure (Azc) unterscheidet sich von ihrem proteinogenen Analogon L-Prolin nur durch eine Ringverkleinerung um eine Methylengruppe (s. auch Einleitung 2.6.2). Es wurde bereits in einigen Arbeiten gezeigt, dass die Inkorporation von Azc Fehlfaltung von Proteinen auslösen kann (Trotter et al., 2001). Azc kompetiert dabei mit Prolin und führt auf Grund der veränderten Konformation des viergliedrigen Ringes zu Fehlfaltung von Prolin enthaltenden Proteinen.

Das Ziel dieser Versuche war der Nachweis von toxischen, fehlgefalteten Spezies, möglicherweise auch mit amyloidem Charakter, in humanen Zellen. Zudem sollte demonstriert werden, dass eine Inhibition des Proteasoms eine Verstärkung der Toxizität auslösen würde. Dazu wurde zunächst ermittelt, welche Menge an Azc für HEK293T-Zellen zytotoxisch war und zur Anhäufung von amyloidem Material führte, jedoch noch keine apoptotische Fragmentierung oder Kondensation des Nukleus bzw. Chromatins provozierten. Diese Konzentration wurde für Azc auf 2 mM bestimmt.



**Abb. 4.94:** Die Zytotoxizität von 2 mM Azc wird durch Inhibition des Proteasoms mit MG132 verstärkt. HEK293T-Zellen wurden mit oder ohne das Prolin-Analogon Azc (2 mM) mit oder ohne MG132 inkubiert und die Zellviabilität mit Hilfe von MTT-Tests festgestellt. Im linken Diagramm wurden alle Werte prozentual zur Kontrolle dargestellt (nicht mit Azc oder MG132 behandelt) im rechten Diagramm jeweils auf die Proben ohne MG132 bezogen.

Zudem wurden verschiedene Konzentrationen des proteasomalen Inhibitors MG132 getestet, welche *per se* wenig oder keine Toxizität induzierten, jedoch akzessorisch zu Azc eine

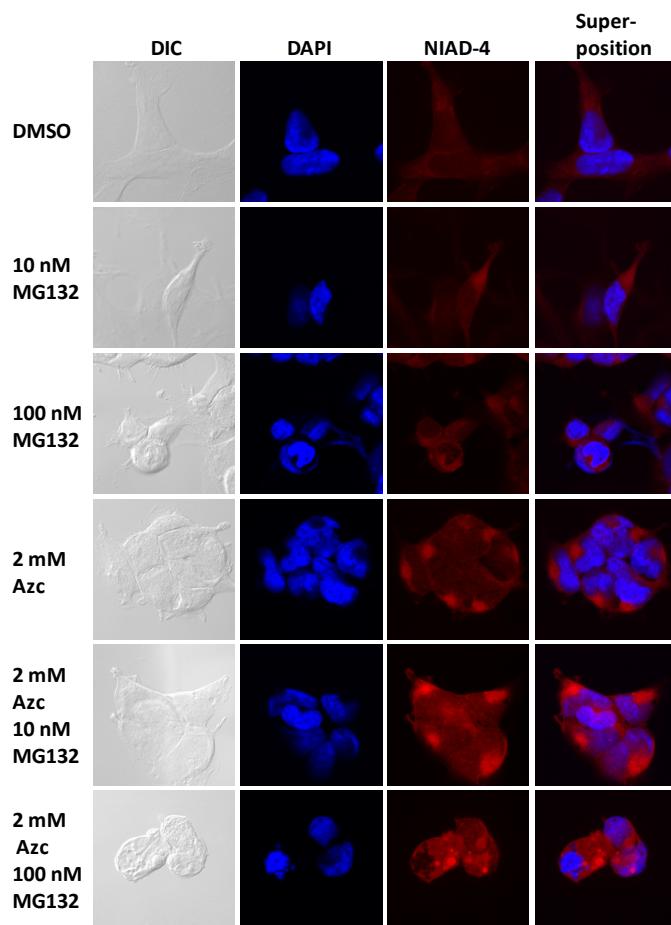
Verstärkung der Zytotoxizität herbeiführten. Diese Mengen lagen zwischen 10 nM und 100 nM MG132. Ebenso wurde die Zeit der auftretenden Toxizität bestimmt, nach welcher keine Ablösung der Zellen von der Unterlage beobachtbar sowie keine apoptotischen Ereignisse detektierbar waren. Die Zeit wurde für das Auftreten toxischer Ereignisse und für die Mikroskopie auf 48 h und für den Nachweis präfibrillärer oligomerer Spezies auf 24 h nach Zugabe des As-Analogons und MG132 bestimmt. 10 nM MG132 verursachten eine leichte Toxizität bei den Zellen, eine stärkere Abnahme der Zytoviability wurde im Beisein von 2 mM Azc ermittelt. Mit mehr Werten wären zwei annähernd sigmoidale Dosis-Wirkungskurven erhalten worden (Daten nicht gezeigt), welche jedoch nicht weiter untersucht wurden, da hier nur das optimale Fenster zwischen Zytotoxizität ohne Apoptose und der Bildung amyloider Spezies bestimmt wurde. Eine Zytotoxizität nach Zugabe des Aminosäureanalogons Azc konnte festgestellt werden, ebenso eine Verstärkung der Zytotoxizität durch steigende Mengen an MG132 (s. Abb. 4.94).

Insgesamt wird die Zytotoxizität des As-Analogons Azc durch den proteasomalen Inhibitor MG132 verstärkt.

#### **4.2.2 Azc in Kombination mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 führt zur Bildung amyloider Aggregate in humanen Zellen**

Es stellte sich die Frage, ob fehlgefaltete Proteine an der Induktion der Zytotoxizität beteiligt waren und ob es sich dabei um amyloide Proteine handelte. Um amyloide Proteine zellbiologisch nachzuweisen, wurden Zellen unter gleichen Bedingungen wie für die Zytotoxizitätsmessungen mit Azc und MG132 inkubiert. Die Zellen wurden mit NIAD-4 wie unter Material und Methoden beschrieben gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Zellen, welche nicht mit Azc oder MG132 behandelt worden waren, zeigten nur eine geringe Hintergrundfärbung mit NIAD-4. Mit 10 nM und 100 nM MG132 zeigte sich bereits eine leichte diffuse rote Färbung in einigen Zellen, welche wesentlich stärker erschien, wenn 2 mM Azc zugegen war. Zusammen mit 2 mM Azc und 100 nM MG132 zeigte sich eine deutliche Zunahme der roten NIAD-4-Färbung sowie das Auftreten von distinkten, scharf begrenzten Aggregaten, was gleichbedeutend mit einer Zunahme von amyloidem Material in den Zellen ist. Die Aggregate unterschieden sich von denen, wie sie im Falle der *de novo* generierten amyloiden Proteine erhalten wurden. Sie ähnelten eher Htt-Aggregaten, sowohl was ihre Größe, als auch ihre Form anbelangt. Die biochemische Natur der Aggregate (Löslichkeit, Molmasse, Adhärenz) wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Diese Aggregate oder Aggregat-ähnlichen amyloiden Spezies traten nicht nur an

einer Stelle in der Zelle auf. Eine perinukleäre Lokalisation war sowohl bei den *de novo* amyloiden Proteine beobachtbar als auch in vielen Fällen bei Htt96Q oder Htt96Q-CL1, in diesem Fall schienen die Aggregate jedoch willkürlich über das gesamte Zytoplasma verteilt und nicht im Nukleus lokalisiert zu sein.



**Abb. 4.95: Die Behandlung von HEK293T-Zellen mit der nicht-kanonischen Aminosäure Azc und dem proteasomalen Inhibitor MG132 führt zur Akkumulation amyloider Spezies.**

Auf Deckgläsern ausgesäte HEK293T-Zellen wurden mit 2 mM Azc mit oder ohne 10 nM oder 100 nM MG132 behandelt. 48 h später wurden sie nach einmaligem Waschen mit PBS in 10-DMEM/F12 unter Zusatz von NIAD-4 inkubiert. Nach einer Stunde wurden sie fixiert und nach Färbung des Nukleus mit DAPI in Mounting-Medium eingebettet. Die qualitative Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops von Leica mit einem Ölimmersionsobjektiv 63x.

Ebenso fiel auf, dass bei steigenden Mengen MG132 und Azc die Größe der Nuklei abnahm, was mit intensiverer DAPI-Färbung einherging. Dies könnten bereits die ersten Anzeichen der Apoptose sein, wobei wie erwähnt versucht wurde, die Schwelle zu finden, bei welcher sie

gerade noch nicht ausgelöst wurde. Eine Fragmentierung der Kerne wurde bei dieser Konzentration von Azc (2 mM) jedoch noch nicht beobachtet, diese trat erst bei 4 mM auf.

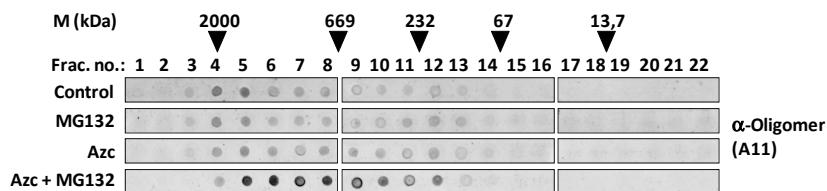
Es wurde also mit NIAD-4 die Bildung von amyloiden Aggregaten oder aggregatähnlichen Strukturen in den Zellen demonstriert.

#### 4.2.3 Das Aminosäureanalogon Azc induziert die Bildung präfibrillärer oligomerer Strukturen in humanen Zellen

Amyloide Spezies schienen also vorhanden zu sein, es sollten dann auch deren Vorläufer, präfibrilläre Oligomere, detektierbar sein. Mit Hilfe des A11-Antikörpers können eben diese Spezies nachgewiesen werden wie bereits am Beispiel der *de novo* amyloiden Proteine gezeigt. Nach Behandlung der Zellen mit Azc und MG132 wurden sie nach verschiedenen Zeiten fixiert und mit dem A11-Antikörper inkubiert. Es zeigte sich jedoch auch in den nicht

behandelten Zellen eine hohe Hintergrundfärbung unter allen getesteten Bedingungen, so dass die indirekte Immunofluoreszenz für die Detektion der präfibrillären Erscheinungsformen nicht geeignet war (Daten nicht gezeigt).

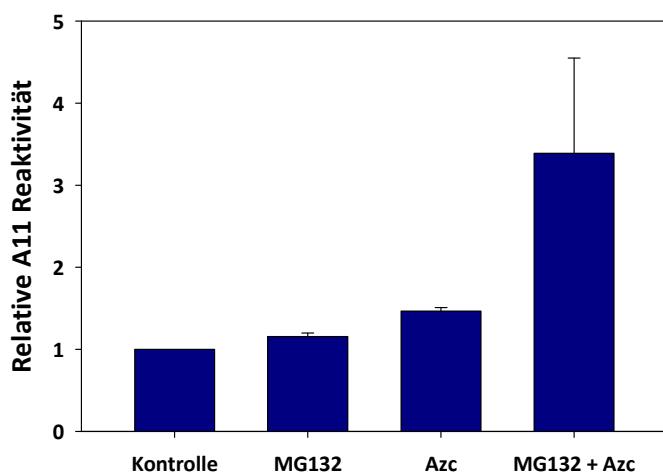
Das gleiche Ergebnis wurde mit biochemischen Methoden erhalten: Wurden Zellen in oben beschriebener Weise behandelt, jedoch im Beisein von 2 mM Azc und Prolin nach verschiedenen Zeiten unter nativen Bedingungen lysiert, die Proteinkonzentration bestimmt, die gleichen Proteinmengen auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mit A11-Ak inkubiert, so wiesen die Probenpunkte sowohl der Kontrolle als auch der behandelten Zellen die gleiche Intensität auf. Dies war der Fall nach verschiedenen Zeiten nach Inkubation mit den Substanzen sowie mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des nativen Lysats (Daten nicht gezeigt). Auch unter diesen Versuchsbedingungen war offenbar zuviel Hintergrundmaterial vorhanden, an welches der A11-Ak binden konnte.



**Abb. 4.96:** Nachweis präfibrillärer oligomerer Spezies nach Azc und MG132 Inkubation. HEK293T-Zellen wurden für 24 Stunden mit und/oder ohne Azc oder MG132 inkubiert und

anschließend unter nativen Bedingungen lysiert. Nach Größenausschlusschromatographie wurden die Fraktionen des nativen Lysates auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mit dem A11-Ak dekoriert. Es wurden bei der Gelfiltration 22 Fraktionen gesammelt.

Dieses Ergebnis wurde auch mit den *de novo* Proteinen erhalten, wenn das native Lysat unfraktioniert *via* Dot Blot analysiert wurde. Da auch die Dichtegradientenzentrifugation unter diesem Aspekt zu keinem signifikanten Unterschied führte (wahrscheinlich Verdünnungseffekt), wurde versucht, die nativen Lysate mit Hilfe der Gelfiltration zu trennen und die präfibrillären Spezies auf diese Weise mit Hilfe des A11-Aks zu visualisieren.



**Abb. 4.97:** Die integrierte normalisierte A11-Reaktivität ist am stärksten nach Behandlung der Zellen mit Azc und MG132.

Die A11-Werte des Dot Blots der verschiedenen Fraktionen einer Probe (Kontrolle, mit MG132 inkubiert, mit Azc inkubiert, mit MG132 und Azc inkubiert) wurden integriert und die Kontrolle gleich eins gesetzt. Die anderen integrierten Werte wurden dann entsprechend auf die Kontrolle normalisiert.

Diese Methode war wieder erfolgreich, hier ließen sich im Falle der Probe Azc und MG132 präfibrilläre oligomere Strukturen beobachten. Die Fraktionen 5 bis 12 wiesen starke Signale des A11-Aks auf, obwohl die gleiche Proteinmenge geladen wurde, stärker als bei z.B. bei  $\beta$ 23 (s. Abb. 4.19) der *de novo* amyloiden Proteine. Die Fraktionen 5 bis 12 entsprechen einer Molmasse von ca. 2000 bis 232 kDa, was auch in etwa der beobachteten Molmasse bei den *de novo* amyloiden Proteinen entspricht (hier ein etwas weiterer Bereich der Molmasse). Das Erscheinen der Signale begann bei Fraktion 5 stets ziemlich abrupt, es trat hier nur eine schmale linke Peaks Schulter auf, während die rechte Schulter bedeutend breiter war (s. Abb. 4.96). Anders als bei der NIAD-4-Färbung und bei der Zytotoxizitätsmessung gab es keine Abstufung zwischen Proben der Kontrolle, MG132, Azc und Azc mit MG132, es traten nur in der Kombination Azc mit MG132 starke Signale auf. Eine Wiederholung der Versuche ergab ein ähnliches Bild, so dass nach Integration der Signale Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet werden konnten, woraus sich Abb. 4.97 ergab.

Bei den durchgeföhrten Versuchen zeigten die Proben, welche zuvor mit MG132 und Azc behandelt worden waren, die intensivsten A11-Signale auf dem Dot Blot, was sich in einer relativen A11-Reaktivität von ca. 3,5 der Probe MG132 *und* Azc im Vergleich zur Kontrolle widerspiegelt. Die Proben, welche mit MG132 *oder* Azc behandelt worden waren, lagen nur geringfügig über dem relativen Wert eins der Kontrolle.

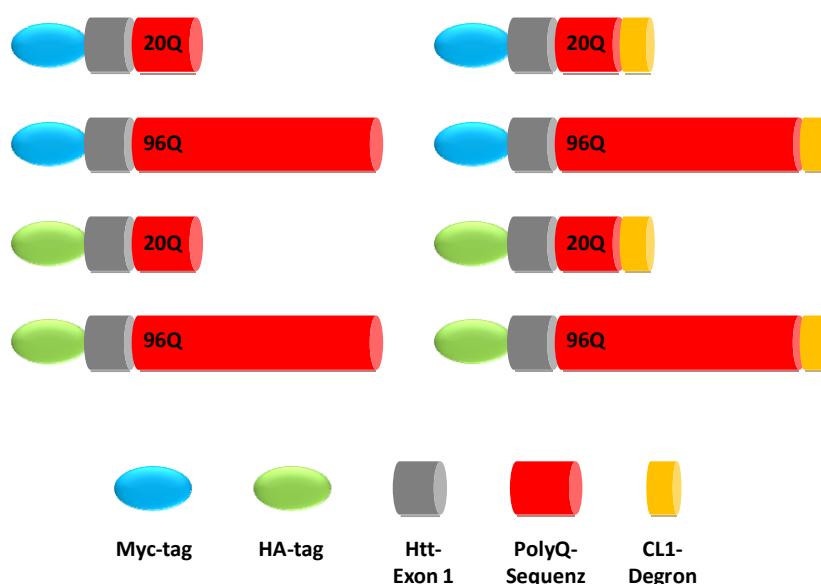
Die Resultate belegen, dass Zelllysate von Zellen, welche mit der Kombination von Azc und MG132 behandelt worden waren, entsprechend ihrer hohen A11-Reaktivität den höchsten Gehalt an präfibrillären Spezies aufweisen.

## 4.3 Analyse von expandiertem Htt mit fusioniertem CL1-Degron

### 4.3.1 Modifikationen des Huntington-Exon 1 mit CL1-Degron, Myc-Tag oder HA-Tag

In diesem Teilprojekt wurde untersucht, inwieweit die Löslichkeit von aggregierendem Htt96Q durch Anfügen des CL1-Tags verändert würde, ob ein Effekt auf das UPS festgestellt werden könnte und *vice versa*, ob die Zytotoxizität durch das Einfügen des CL1-Degrans verändert sein würde und wenn ja, ob und mit welchen Methoden die Toxizität vermindert werden könnte. Dies wurde wiederum im mammalischen System (HEK293T-Zellen) durchgeführt, da einerseits *C. Huntington*, verursacht durch die expandierte PolyQ-Sequenz des Htt, relevant im Menschen ist, andererseits das angefügte CL1-Degron keine evolutionär bedingten spezifischen Interaktionen mit dem menschlichen Proteom eingehen sollte (keine hohen Ähnlichkeiten zu menschlichen Proteinen). Dennoch wurde bereits gezeigt (Bence et al, 2001), dass das CL1-Degron durchaus Interaktionen mit dem mammalischen System, insbesondere dem UPS, eingeht. Vor diesem Hintergrund war eine Untersuchung des Verhaltens des UPS im Zusammenspiel mit exprimierten Htt-Mutanten interessant.

Um den Einfluss des CL1-Degrans auf das Verhalten des Huntington-Exon 1 mit 20 Glutaminresten (20Q) oder 96 Glutaminresten (96Q) zu untersuchen, wurden entsprechende Fusionskonstrukte generiert.



**Abb. 4.98:** Überblick über die Htt-Konstrukte mit oder ohne CL1-Degron.

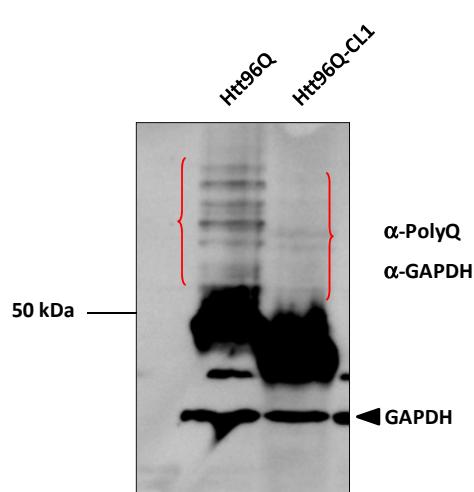
Exon 1 des humanen Huntingins (Htt) mit verschiedenen langen Polyglutaminsequenzen (20Q oder 96Q) wurde N-terminal mit einem Myc-Tag oder einem HA-Tag versehen, um Kreuzreaktionen vornehmen zu können. Das CL1-Degron wurde an den C-Terminus von Myc-Htt20Q/96Q oder HA-Htt20Q/96Q fusioniert.

Das CL1-Degron wurde dabei an den C-Terminus an das von Exon 1 codierte

Huntinginfragment (Htt) fusioniert. Um Kreuzreaktionen verschiedener mit CL1 verbundener Huntingin-Konstrukte und nicht modifizierter Konstrukte auszuschließen, wurden die Konstrukte mit oder ohne CL1-Degron N-terminal mit verschiedenen molekularen Kennzeichen (Tags) versehen, welche einen immunzytochemischen Nachweis ermöglichen.

### 4.3.2 Htt96Q aggregiert stärker als Htt96Q-CL1

Um die Mengen an aggregiertem Material in Zellen zu bestimmen, die mit Htt96Q oder Htt96Q-CL1 transfiziert worden waren, wurden die Zellen 24 h nach Transfektion lysiert und mit 2 % SDS oder mit Ameisensäure behandelt, um die Aggregate zu solubilisieren. Mit den Lysaten in 2 % SDS wurde ein Filterretardationstest (Slot Blot) durchgeführt, die mit Ameisensäure behandelten Lysate wurden parallel einem Western Blot unterzogen, um das gesamte exprimierte Material zu visualisieren.

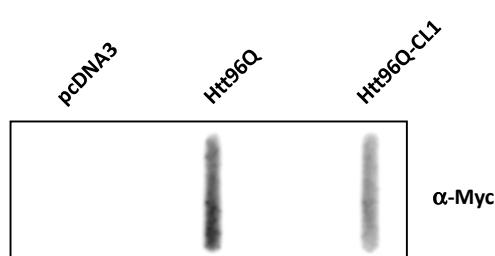


**Abb. 4.99: Htt96Q und Htt96Q-CL1 werden in HEK293T-Zellen exprimiert und zeigen eine anomale apparente Molmasse.**

HEK293T-Zellen wurden mit 7,5 µg Plasmid für die Konstrukte für Htt96Q und Htt96Q-CL1 transfiziert. Die Zellen wurden einen Tag nach Transfektion lysiert, mit Ameisensäure erhitzt und nach Justierung des pH-Wertes auf ca. 7 die Proteinmengen via SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Htt-Proteine wurden mit einem gegen PolyQ gerichteten Ak nachgewiesen. Die roten Klammern markieren die in den meisten Fällen nach Expression von Htt96Q und Htt96Q-CL1 beobachtete Leiter. Parallel dazu wurde ein Filterretardationstest (s. Abb. 4.100) durchgeführt.

Abb. 4.99 zeigt die Gesamtproteinmenge von Htt96Q

und Htt96Q-CL1, sowohl die nativ löslichen Anteile, als auch die sonst unlöslichen Anteile. Obwohl das Gel überladen wurde, kann man doch erkennen, dass Htt96Q und Htt96Q-CL1 24 h nach Transfektion in etwa gleichen Mengen exprimiert wurden, sowohl die Myc-markierten Varianten (s. Abb. 4.99) als auch die HA-markierten Varianten (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.99 wird zudem deutlich, dass sich die apparenten Molmassen von Htt96Q und Htt96Q-CL1 deutlich unterscheiden. Dies wurde zwar erwartet, jedoch in reverser Weise: Htt96Q-CL1 wurde bei höherer Molmasse antizipiert, Htt96Q bei geringerer, hier bewegte sich Htt96Q-CL1 mit geringerer apparenter Molmasse.



**Abb. 4.100: Es werden weniger Htt96Q-CL1-Aggregate als Htt96Q-Aggregate im Filter retardiert.**

HEK293T-Zellen wurden mit 7,5 µg Plasmid für die Konstrukte für Htt96Q und Htt96Q-CL1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert und später mit 2 % SDS versetzt. Gleiche Mengen der Lysate wurden einem Filterretardationstest unterzogen (Porenweite des Filters: 0,2 µm) und die Htt-Konstrukte mit Hilfe des α-Myc-Aks nachgewiesen. Parallel dazu wurde ein Western Blot des Gesamtproteins (s. Abb. 4.99) durchgeführt.

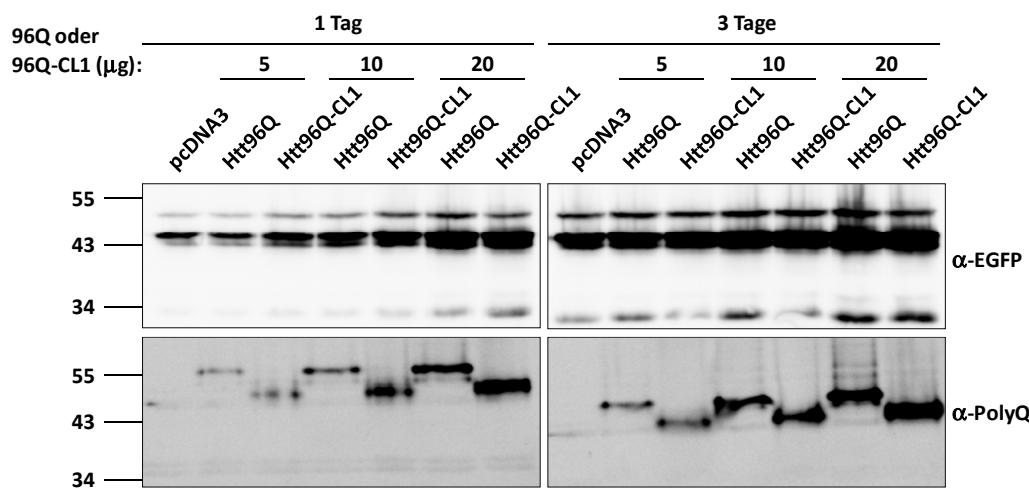
Noch etwas fällt in Abb. 4.99 auf: Über Htt96Q bzw. Htt96Q-CL1 findet sich ein Leiterähnliches Muster. Dieses Muster wurde auch detektiert, wenn der Blot mit einem Ak gegen

PolyQ allein dekoriert worden war, so dass eine Kreuzreaktion des hier mit verwendeten  $\alpha$ -GAPDH-Aks ausgeschlossen werden kann. Der in Abb. 4.100 abgebildete Filterretardationstest demonstrierte, dass Htt96Q mehr aggregiertes Protein in HEK293T-Zellen ablieferte als Htt96Q-CL1. Wie erwartet wurde in der Kontrolle, wo das leere Plasmid pcDNA3 exprimiert wurde, kein  $\alpha$ -Myc-Signal aufgefangen.

Der Vergleich zum Western Blot verdeutlicht damit, dass bei ungefähr gleichen Mengen exprimierten Gesamtproteins die Aggregatbildung bei Htt96Q-CL1 vermindert ist.

#### 4.3.3 Htt96Q-CL1 inhibiert das UPS nach 24-stündiger Expression stärker als Htt96Q

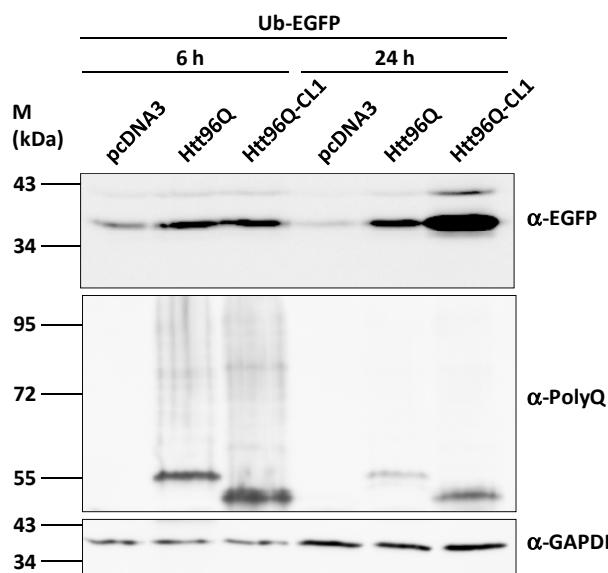
Es wurde eine zeit- und mengenabhängige Titration der HttXQ/HttXQ-CL1-Konstrukte sowie des Reporterproteins Ub-EGFP vorgenommen, um mögliche Auswirkungen der exprimierten Htt-Konstrukte auf das UPS zu analysieren. Zunächst wurde eine Titration der Ub-EGFP-Plasmidmenge nach 24 Stunden durchgeführt, wobei sich zeigte, dass 7,5  $\mu$ g des Plasmids nach Elektroporation die optimale Menge darstellten, um eine Inhibition des UPS zu detektieren, dabei aber sensibel genug war, auf Änderungen der Inhibition zu reagieren. Die Akkumulation von Ub-EGFP wurde nach Inhibition des UPS, insbesondere des Proteasoms, erwartet, wobei der proteasomale Inhibitor MG132 als Positivkontrolle genutzt wurde.



**Abb. 4.101: Unterschiede der Inhibition des UPS zwischen Htt96Q und Htt96Q-CL1 sind 24 h nach Transfektion am deutlichsten.** HEK293T-Zellen wurden mit 7,5  $\mu$ g Plasmid für das Reporterprotein Ub-EGFP und den in der Abbildung angegebenen Mengen der Konstrukte für Htt96Q und Htt96Q-CL1 transfiziert. Die Zellen wurden einen Tag bzw. drei Tage nach Cotransfektion lysiert und die Proteinmengen via SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Das Reporterprotein Ub-EGFP wurde mit Hilfe eines Aks gegen EGFP nachgewiesen, die Htt-Proteine mit einem gegen PolyQ gerichteten Ak.

In den nächsten Titrationsexperimenten wurde die Menge an eingesetztem Plasmid der Htt-Konstrukte sowie die zeitliche Abhängigkeit der UPS-Inhibition untersucht. In Abb. 4.101 wird deutlich, dass die Unterschiede in der Akkumulation des Reporterproteins Ub-EGFP mit

geringeren Mengen (5 µg) der Htt-Plasmide stärker ausfallen als mit höheren Mengen (z.B. 20 µg), wo sich die Unterschiede nivellieren. Nach drei Tagen waren die Unterschiede ebenfalls nicht mehr so eindeutig wie 24 h nach Cotransfektion der Konstrukte. Es wäre möglich gewesen, dass die Unterschiede der Inhibition des UPS, nachweisbar durch die Akkumulation von Ub-EGFP, bereits kurz nach der Transfektion am deutlichsten sind. Deshalb wurde die Inhibition kurz nach Cotransfektion der Zellen mit 7,5 µg Ub-EGFP und Htt-Konstrukten untersucht (s. Abb. 4.102). Bereits 6 h nach Cotransfektion waren die beiden Konstrukte in den Zellen exprimiert, und es zeigte sich auch eine deutliche Inhibition des UPS in Anwesenheit von Htt96Q und Htt96Q-CL1. Es waren jedoch keine Unterschiede der Akkumulation von Ub-EGFP mit Htt96Q und Htt96Q-CL1 feststellbar. Die Differenzen traten erst 24 h nach Cotransfektion auf: Die Inhibition des UPS, nachgewiesen durch Akkumulation von Ub-EGFP in Gegenwart von Htt96Q-CL1, war um mehr als drei Größenordnungen höher (normalisiert auf GAPDH), als mit Htt96Q.



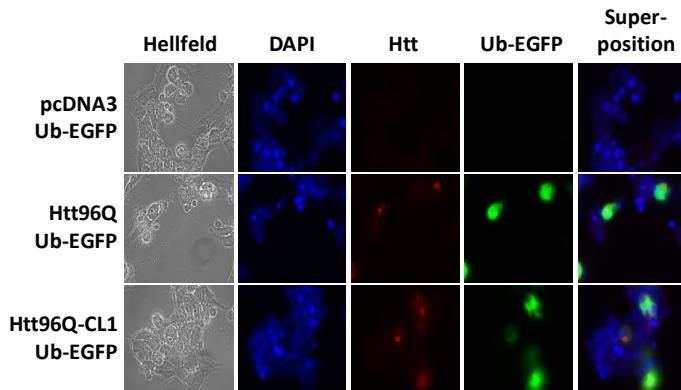
**Abb. 4.102: Htt96Q-CL1 inhibiert das UPS stärker als Htt96Q ohne CL1-Degron.**

HEK293T-Zellen wurden mit 7,5 µg Plasmid für das Reporterprotein Ub-EGFP und die Konstrukte für Htt96Q und Htt96Q-CL1 cotransfiziert. Die Zellen wurden 6 h bzw. 24 h nach Cotransfektion lysiert und die Proteinmengen *via* SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Das Reporterprotein Ub-EGFP wurde mit Hilfe eines Aks gegen EGFP nachgewiesen, die Htt-Proteine mit einem gegen PolyQ gerichteten Ak. GAPDH wurde als unbeeinflusstes Haushaltsprotein detektiert, um eine Normalisierung von Ub-EGFP vornehmen zu können und diente gleichzeitig der Ladungskontrolle.

Abbildung 4.102 zeigt zudem, dass der SDS-lösliche Anteil an Htt96Q-CL1 in

etwas höheren Mengen vorliegt als Htt96Q, obwohl gleiche Mengen an Plasmid unter gleichen Parametern transfiziert wurden (s. demgegenüber auch Filterretardationstest). Sechs Stunden nach Transfektion war mehr Htt-Protein vorhanden als 24 h nach Transfektion, dagegen nahm die Ub-EGFP-Menge sowie das Proteinlevel an GAPDH 24 h nach Transfektion zu. Um dies nachzuweisen, wurden HEK293T-Zellen mit dem Reporterprotein Ub-EGFP und den entsprechenden Htt96Q- und Htt96Q-CL1-Konstrukten cotransfiziert und die Zellen mikroskopisch analysiert. Eine Inhibition des UPS sollte sich auch mit Hilfe des Reporterproteins Ub-EGFP auf zellulärer Ebene zeigen. Es zeigte sich, dass in genau den Zellen, in welchen Htt96Q oder Htt96Q-CL1 exprimiert wurde, eine Akkumulation des

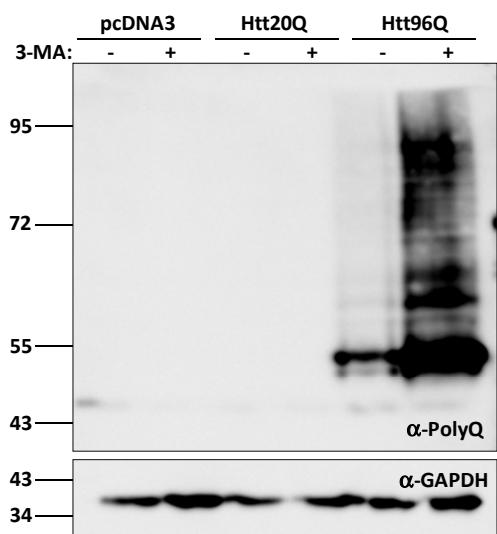
Reporterproteins Ub-EGFP stattfand, sofern eine Cotransfektion von Htt-Konstrukten und Ub-EGFP erfolgte. Dabei war jedoch kein Unterschied zwischen der Fluoreszenz-Intensität von Ub-EGFP zusammen mit Htt96Q oder Htt96Q-CL1 detektierbar.



**Abb. 4.103: Htt96Q und Htt96Q-CL1 lassen Ub-EGFP nachweisbar in einzelnen Zellen akkumulieren.**

HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Co-transfektion mit Htt-Konstrukten und dem Reporter Ub-EGFP mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit DAPI und einem  $\alpha$ -Myc-Cy3-Ak inkubiert. Das Reporterprotein Ub-EGFP wurde auf Grund seiner Fluoreszenz detektiert. Die Analyse erfolgte im Zeiss-Mikroskop der Abteilung, Objektiv: 63x,  $\times$  Olimmersion.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass Htt96Q auch über Autophagie (hauptsächlich über Makroautophagie und CMA, s. Einleitung 2.4) degradiert wird, was einen zum UPS kompetitiven Mechanismus darstellt (s. Abb. 4.104).



**Abb. 4.104: Htt96Q wird auch durch Autophagie degradiert.**

HEK293T-Zellen wurden 6 h nach Transfektion mit dem Autophagie-Inhibitor 3-Methyladenin (3-MA) inkubiert und 18 h später lysiert, per SDS-PAGE getrennt und Htt-Protein mit Hilfe eines  $\alpha$ -PolyQ-Aks detektiert. Es ist anzumerken, dass der  $\alpha$ -PolyQ-Ak PolyQ-Sequenzen mit weniger als 35 Glutaminresten nur schlecht erkennt.

Aus Abb. 4.104 wird deutlich, dass eine Hemmung der Autophagie mit 3-MA stattfand und Htt96Q nach Zugabe des Inhibitors akkumulierte. Dieser  $\alpha$ -PolyQ-Ak bindet PolyQ-Sequenzen < 35 Q nur schwach, so dass auf Grund der niedrigen

Signalstärke keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob 3-MA auch zu einer Anhäufung von Htt20Q führte.

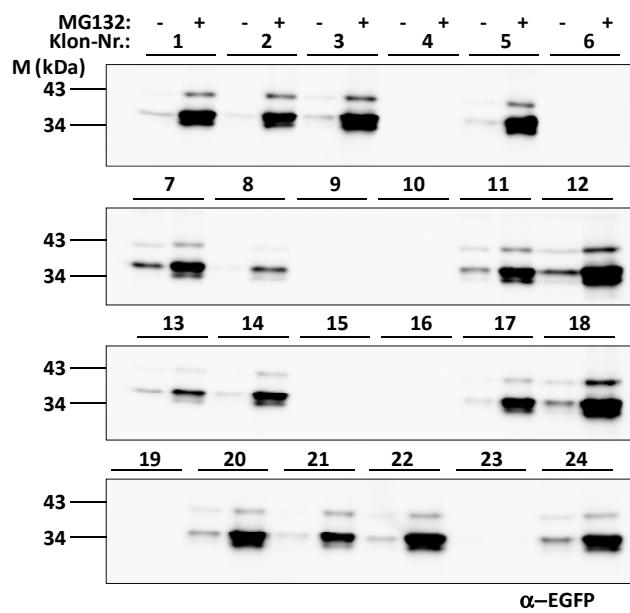
Es wurde in diesem Abschnitt mit biochemischen und zellbiologischen Methoden demonstriert, dass Htt96Q und Htt96Q-CL1 das Proteasom hemmen, wobei die Inhibition im Falle von Htt96Q-CL1 stärker ist als durch Htt96Q.

#### 4.3.4 Generierung einer stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP

Htt96Q und in stärkerem Maße Htt96Q-CL1 inhibierten das UPS, biochemisch mit Hilfe des Reporterproteins Ub-EGFP nachgewiesen. Um dies eventuell auch zellbiologisch quantitativ

nachweisen zu können, wurden HEK293T-Zellen mit Ub-EGFP und den Htt-Konstrukten cotransfiziert und einer FACS-Analyse unterzogen. Es zeigten sich jedoch nur minimale Unterschiede der Inhibition (Akkumulation an Ub-EGFP, Daten nicht gezeigt), was wahrscheinlich darauf zurückzuführen war, dass nur wenige Zellen mit Htt-Konstrukten und Ub-EGFP cotransfiziert waren, was biochemisch, aber nicht zellbiologisch mit der FACS-Analyse nachzuweisen war.

Daher wurde eine Zelllinie (HEK293T-Zellen) generiert, die das Reporterprotein Ub-EGFP stabil überexprimiert. Dazu wurden HEK293T-Zellen transient mit dem Plasmid codierend für das Reporterprotein Ub-EGFP transfiziert und unter Zugabe des Antibiotikums G418 selektiert (s. Material und Methoden 3.2.3.8), weitere Untersuchungen der stabilen Klone erfolgten biochemisch und zellbiologisch mittels FACS-Analyse.



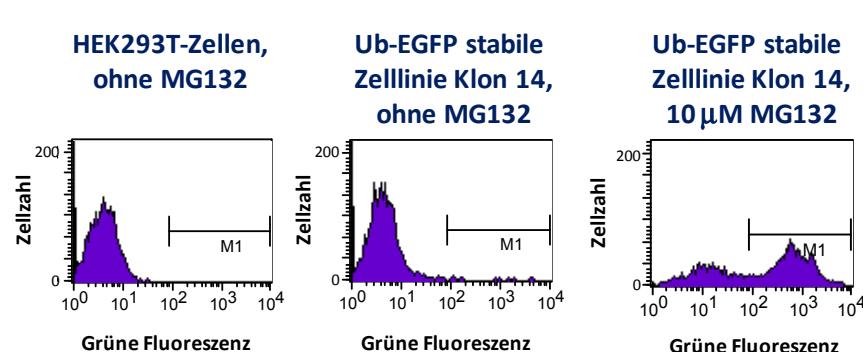
**Abb. 4.105: Selektion von 16 positiven Klonen der stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP.**  
Stabile Klone wurden ca. sechs Wochen nach Transfektion 1:1 separiert und über Nacht mit oder ohne den proteasomalen Inhibitor MG132 inkubiert. Hiernach wurden die unterschiedlich behandelten Duplikate lysiert und mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot analysiert.  
Als positive Klone wurden 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 20, 21, 22 und 24 identifiziert.

Die biochemische Analyse von 24 Klonen (s. Abb. 4.105) ergab, dass nur 16 Klone Ub-EGFP exprimierten und auf den proteasomalen Inhibitor MG132 reagierten. Unter diesen Klonen wurde derjenige selektiert, welcher das höchste

Verhältnis von akkumuliertem Ub-EGFP nach MG132-Inkubation zu exprimiertem Ub-EGFP ohne MG132-Inkubation aufwies. Eine absolut hohe Anhäufung des Ub-EGFP wurde hier also nicht als optimal angesehen (z.B. Klon 12), da das Verhältnis mit/ohne MG132 nicht so hoch war wie bei z.B. Klon 14 oder 17. Anhand dieses Verhältnisses und wegen seiner hohen Wachstumsrate wurde Klon 14 für weitere Versuche ausgewählt.

Nach weiterer stringenter Selektion mit G418 wurde der Klon mit Hilfe der FACS-Analyse näher untersucht (s. Abb. 4.106), ob eine Akkumulation des Ub-EGFP nachweisbar wäre. Dazu wurden wiederum Duplikate des Klons 14 ausgesät und mit oder ohne den proteasomalen Inhibitor inkubiert. Klon 14 zeigte nach 18-stündiger Inkubation mit MG132 in über 50 % der Zellen eine Akkumulation des Reporterproteins Ub-EGFP auf mehr als die

2. Dekade der grünen Fluoreszenz-Skala (logarithmisch), wobei das Maximum der Fluoreszenz bei ca. 150 lag. Eine Subpopulation verschob sich hingegen nur auf die Intensität 10 der grünen Fluoreszenz.



**Abb. 4.106: Ub-EGFP akkumuliert nach Inkubation von HEK293T—Ub-EGFP-Zellen mit MG132.**

Die stabile Zelllinie wurde für 18 h mit oder ohne 10  $\mu$ M MG132 inkubiert und anschließend einer FACS-Analyse unterzogen. Mehr als 50 % der stabil transfizierten mit MG132

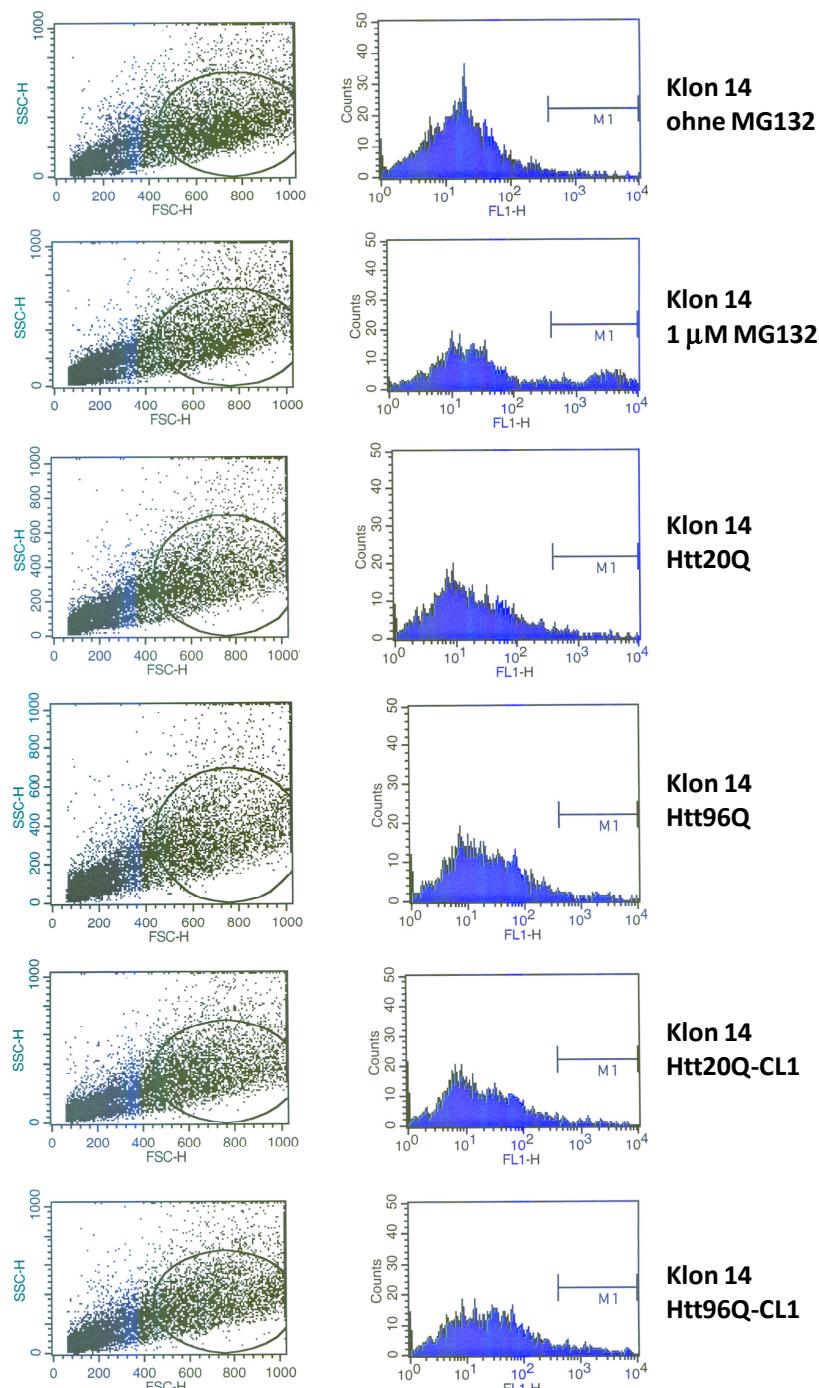
behandelten Zellen zeigte eine grüne Fluoreszenz oberhalb der 2. Dekade. Als Kontrolle dienten zum einen Zellen der stabilen Zelllinie ohne MG132-Behandlung und nicht-transfizierte HEK293T-Zellen.

Dies zeugte dennoch von einer Anhäufung des Reporters, da ohne MG132 die maximale Zellzahl bei ca. 5 der grünen Fluoreszenz lag (ebenso die Kontrolle der nicht-transfizierten HEK293T-Zellen).

Damit war erwiesen, dass sich Klon 14 prinzipiell für Analysen der Inhibition des UPS per FACS-Analyse eignete.

#### 4.3.5 FACS-Analysen demonstrieren eine Akkumulation des stabil exprimierten Ub-EGFP nach Expression von Htt96Q-CL1

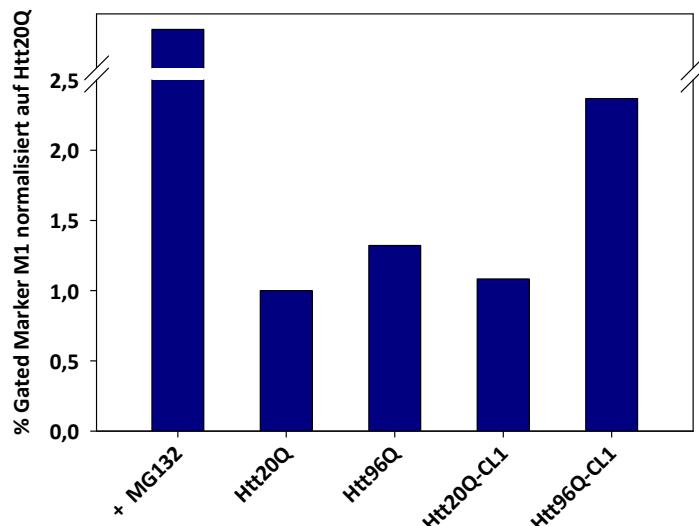
Mit der nun generierten stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP wurden erneut FACS-Versuche durchgeführt. Die entsprechenden Htt-Konstrukte wurden in die stabile Zelllinie *via* Elektroporation transfiziert und 24 h später wurden die Zellen einer FACS-Analyse unterzogen. Als Positivkontrolle dienten Zellen der stabilen Zelllinie, welche mit 1  $\mu$ M des proteasomalen Inhibitors MG132 behandelt worden waren. Die Einstellung der Parameter erfolgte mit Hilfe von nicht-transfizierten HEK293T-Zellen bzw. nicht mit MG132 inkubierten Zellen der stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP. Die FACS-Messung ergab das Maximum der grünen Fluoreszenz bei unbehandelten Zellen der stabilen Zelllinie bei ca. 20, während es bei Inkubation mit MG132 zu einer bimodalen Verteilung der grünen Fluoreszenz kam, mit den Maxima bei 20 und 4000. Das lokale Maximum bei ca. 4000 repräsentierte damit die durch MG132 akkumulierten Ub-EGFP-Proteine in den Zellen. Im Gegensatz zu der unbehandelten Probe führte die Transfektion der Htt-Konstrukte ebenfalls zu einem Anstieg grüner Fluoreszenz. Sichtbar ist dieser Anstieg hier besonders in Anwesenheit von exprimiertem Htt96Q-CL1.



**Abb. 4.107: FACS-Analysen belegen eine Inhibition des UPS durch Htt-Mutanten.** Zellen der stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP wurden mit den Htt-Konstrukten Htt20Q, Htt96Q, Htt20Q-CL1 und Htt96Q-CL1 transfiziert, 24 h später gewaschen und in PBS resuspendiert. Parallel wurden Zellen der stabilen Zelllinie mit 1 µM MG132 inkubiert. Initiale Einstellungen der Parameter der FACS-Messung wurden u.a. an den nicht-behandelten Zellen der stabilen Zelllinie vorgenommen. Es wurden nur Zellen für die Messung herangezogen, welche eine ausreichende Größe (FSC-H) und Dichte (SSC-H) besaßen (Gate, s. linke Spalte der Abbildung). Für die Fluoreszenzmessungen wurde ein Marker M1 von 300 bis 10.000 der grünen Fluoreszenzintensität gesetzt (FL1-H, Verschiebung zur höherer grüner Fluoreszenz bei Akkumulation von Ub-EGFP). Es wurden insgesamt 10.000 Zellen gemessen.

Eine Quantifizierung der Zellen mit verstärkter grüner Fluoreszenz (s. Abb. 4.108) machte deutlich, dass die unterschiedlichen Htt-Konstrukte zu

unterschiedlich starker Akkumulation der grünen Fluoreszenz, und auch Anhäufung von Ub-EGFP, also Inhibition des UPS, führten, wobei in Anwesenheit von Htt96Q-CL1 eine deutlich höhere Fluoreszenz sichtbar wurde als mit Htt96Q, Htt20Q oder Htt20Q-CL1.



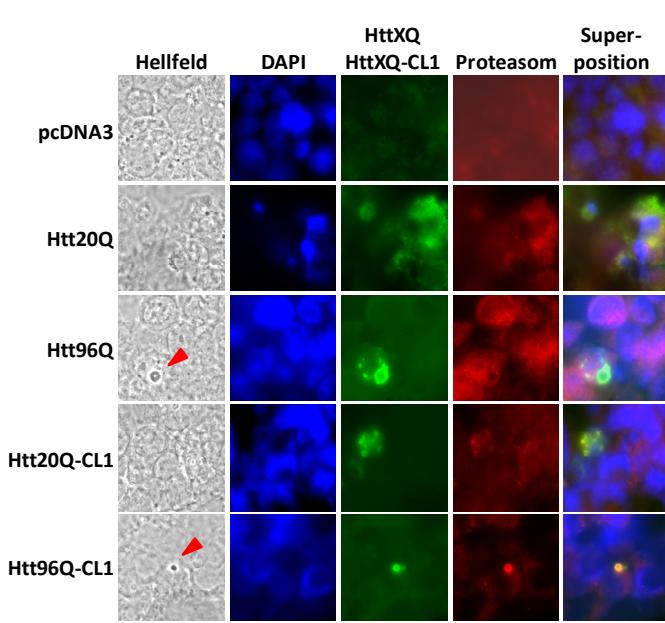
**Abb. 4.108: Quantifizierung der FACS-Analysen demonstrieren eine Verstärkung der grünen Fluoreszenz in Gegenwart von Htt96Q-CL1.**

Die FACS-Experimente wurden quantifiziert, dabei wurden die im markierten Bereich (Gate) liegenden Zellen und im Bereich des Markers M1 liegende grüne Fluoreszenz auf die Probe von Htt20Q normalisiert. + MG132 zeigt die Positivkontrolle an, welche eine im Vergleich zu den transfizierten Zellen weitaus stärkere grüne Fluoreszenz aufwies. Die Quantifizierung bezieht sich auf das in Abb. 4.107 dargestellte FACS-Experiment.

Zusammenfassend ergab also auch die FACS-Analyse der Htt-Konstrukte in der stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP eine Akkumulation von Ub-EGFP in Anwesenheit insbesonders von Htt96Q-CL, was die biochemischen Befunde untermauerte.

#### 4.3.6 Htt96Q-CL1 colokalisiert mit dem Proteasom

Es stellte sich die Frage, ob die vermehrte Inhibition des UPS durch die Expression von Htt96Q-CL1 eine direkte Wirkung auf das Proteasom darstellt und/oder andere Komponenten des UPS durch Htt96Q-CL1 blockiert wurden. Einen weiteren Hinweis auf die direkte Beteiligung des Proteasoms bei der Inhibition des UPS gab die Colokalisation der Htt-CL1 Proteine mit dem Proteasom. Das Proteasom wurde in Abb. 4.109 mit Hilfe eines Aks gegen die ATPase-Untereinheit Rpt1 (S7) nachgewiesen. Die Proteasomen sind homogen über die gesamte humane Zelle verteilt, sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Auch Htt20Q wird homogen in den Zellen verteilt exprimiert, wobei aber wie erwartet mehr Material im Zytoplasma detektiert wurde, nur ein geringer Prozentsatz wurde auch im Zellkern angefärbt. Deshalb wurde natürlich eine Colokalisation zwischen Htt20Q und den Proteasomen im Zytoplasma nachgewiesen. Ein ganz anderes Bild bot die Expression von Htt96Q: Dieses lag ausnahmslos in Aggregaten vor, es wurde kein lösliches Material von Htt96Q detektiert. Meistens wurde, wie in der vorstehenden Abbildung, ein großes Aggregat (größer und mit definierter runder Form) perinuklear gefunden, daneben Satelliten-Aggregate, welche ebenfalls perinuklear organisiert waren. Häufig war der Nukleus aufgrund der physischen Anwesenheit des großen Aggregates deformiert (nach innen ausgebeult), so dass es manchmal den Anschein hatte, als lägen die Aggregate intranuklear vor, was jedoch nicht der Fall war. Die Aggregate waren teilweise so groß und kompakt, dass sie wie in Abb. 4.109, auf Grund ihrer Lichtbrechung sogar im Hellfeld gut zu sehen waren (rote Pfeile).



**Abb. 4.109: Htt96Q-CL1 colokalisiert stärker mit dem Proteasom als Htt96Q.**

HEK293T-Zellen wurden mit den Myc-markierten Konstrukten Htt20Q, Htt96Q, Htt20Q-CL1 und Htt96Q-CL1 sowie einem leeren Vektor transfiziert und 24 h später mit Methanol fixiert und mit  $\alpha$ -Myc-Ak (Maus) dekoriert, der sekundäre Ak war  $\alpha$ -Maus konjugiert an FITC. Das Proteasom wurde mit Hilfe des gegen die Untereinheit des Proteasoms gerichteten Aks nachgewiesen:  $\alpha$ -19S Regulator ATPase Subunit Rpt1 (S7) aus dem Kaninchen, polyklonal.  $\alpha$ -Kaninchen-Cy3 wurde als sekundärer Ak verwendet. Die roten Pfeile indizieren Aggregate des Htt96Q oder Htt96Q-CL1, welche in der Hellfeld-Aufnahme durch Lichtbrechung sichtbar wurden. Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss der Abteilung gemacht (Objektiv: 63x, Öllimmersion).

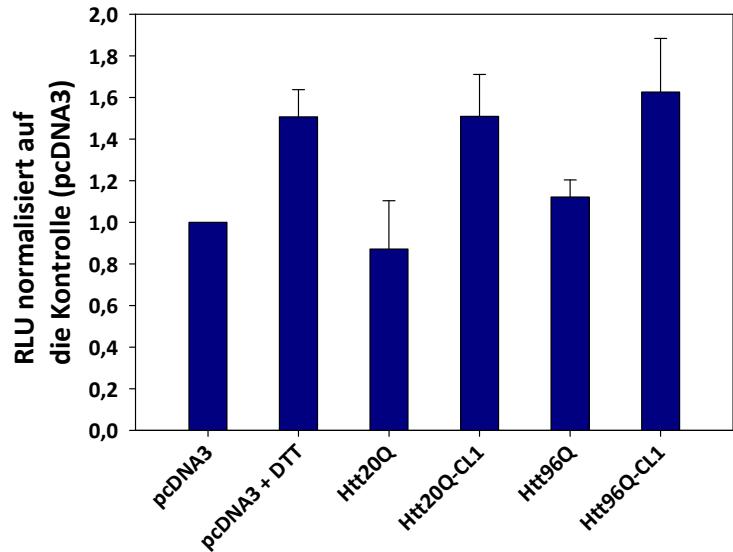
Die Aggregate von Htt96Q-CL1 waren gut zu detektieren; im Schnitt wiesen sie einen geringeren Durchmesser auf (nur Abschätzung, nicht quantifiziert) und die Satelliten fehlten häufig. Charakteristisch sowohl für Htt96Q als auch für Htt96Q-CL1 war eine Aussparung der Färbung in den großen Aggregaten, was insgesamt den Eindruck einer Hohlkugel verstärkte. Eine 3D-Aufnahme mit Hilfe konfokaler Mikroskopie bestätigte diese Annahme (Bild nicht gezeigt).

Htt20Q-CL1 lag ebenfalls in Aggregat-ähnlichen Strukturen vor, was ein wenig unerwartet war, da Htt20Q homogen über die Zelle verteilt vorlag. Jedoch unterschieden sich die Aggregate oder Aggregat-ähnlichen Strukturen stark von denen des Htt96Q oder Htt96Q-CL1. Während es sich bei letzteren um genau abgegrenzte, definierte und kompakte Körper handelte, waren die Aggregat-ähnlichen Strukturen des 20Q-CL1 eher diffus und also auf das CL1-Degron zurückzuführen.

Mit Htt96Q war nur eine sehr schwache Colokalisation mit Proteasomen zu beobachten. Htt20Q-CL1 zeigte bereits eine deutliche Colokalisation mit Proteasomen im Zytoplasma, während es mit den Aggregaten des Htt96Q-CL1 zu einer sehr starken Colokalisation mit Proteasomen kam. Diese schienen geradezu von dem Aggregat angezogen bzw. Proteasomen in oder um das Aggregat rekrutiert worden zu sein. Auch hier zeigte sich wieder eine Aussparung der proteasomalen Färbung, wenn es sich um Colokalisationen mit großen Htt96Q-CL1-Aggregaten handelte.

### 4.3.7 Htt96Q-CL1 induziert die UPR stärker als Htt96Q

Es konnte gezeigt werden, dass Htt96Q-CL1 nicht nur löslicher ist, das UPS stärker inhibiert und deutlicher mit Proteasomen colokalisiert als Htt96Q, sondern auch die UPR stärker induzierte als es mit der Expression von Htt96Q möglich war.



**Abb. 4.110: Htt96Q-CL1 und Htt20Q-CL1 induzieren die UPR stärker als Htt20Q oder Htt96Q.**

HEK293T-Zellen wurden mit den Konstrukten Htt20Q, Htt96Q, Htt20Q-CL1, Htt96Q-CL1, einem leeren Vektor und einem Vektor mit Luciferase hinter einem BiP-Promotor cotransfiziert. Als Positivkontrolle dienten cotransfizierte Zellen mit einem leeren Vektor (pcDNA3) und Luciferase hinter dem BiP-Promotor versetzt mit DTT, um die UPR zu induzieren. Die Zellen wurden 24 h nach Cotransfektion lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Dargestellt ist hier die auf die Kontrolle normalisierte Luciferaseaktivität.

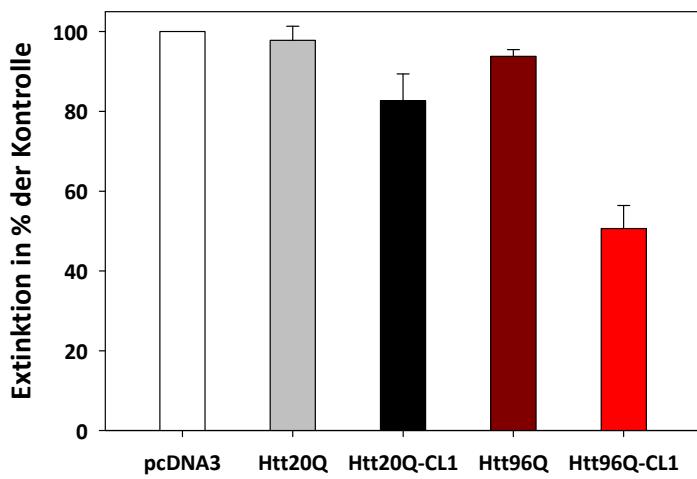
Eine Induktion der Luciferase hinter dem BiP-Promotor, und damit ein Maß für die UPR, konnte mit DTT als Positivkontrolle erreicht werden, hier betrug die Induktion das 1,5-fache der nicht-induzierten Kontrolle. Auch nach Transfektion der Zellen mit Htt20Q-CL1 und Htt96Q-CL1 konnte eine Induktion auf das 1,5- bzw. 1,6-fache der nicht-induzierten Kontrolle erreicht werden. Nach Transfektion mit Htt20Q und Htt96Q konnte keine Induktion bzw. nur eine Induktion auf das 1,2-fache der Kontrolle erreicht werden.

Ein ähnliches Induktionsexperiment wurde mit Hilfe des Reporterproteins Luciferase, welches hinter den Promotor für Hsp70 geschaltet war, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden HEK293T-Zellen, welche mit einem leeren Plasmid transfiziert worden waren, einem zweistündigen Hitzeschock ausgesetzt. Es zeigte sich jedoch in keiner der mit Htt-Konstrukten transfizierten Zellen eine Induktion des Luciferase-Signals und damit der HSRs (Daten nicht gezeigt).

Die Induktion der UPR wurde in höherem Maße durch die CL1-markierten Konstrukte erreicht, so dass das CL1-Degron als der verantwortliche Part für die Induktion der UPR angesehen werden kann.

### 4.3.8 Htt96Q-CL1 ist zytotoxischer als Htt96Q

Es gab Hinweise, dass das CL1-Degron in dem benutzten Zellsystem eine verstärkte Zytotoxizität auslösen würde (stärkere Hemmung des UPS, stärkere Induktion der UPR). Um dies zu überprüfen, wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Htt-Konstrukten transfiziert und MTT-Tests durchgeführt.



**Abb. 4.111:** Htt96Q-CL1 ist zytotoxischer als Htt96Q; Htt20Q-CL1 zeigt eine leicht erhöhte Zytotoxizität gegenüber Htt20Q.

HEK293T-Zellen wurden mit 30 µg der entsprechenden Plasmide *via* Elektroporation transfiziert. Drei Tage später wurden von 250.000 ausgesäten Zellen ein MTT-Test durchgeführt. Die Extinktionen wurden auf die Kontrolle (pcDNA3) normalisiert.

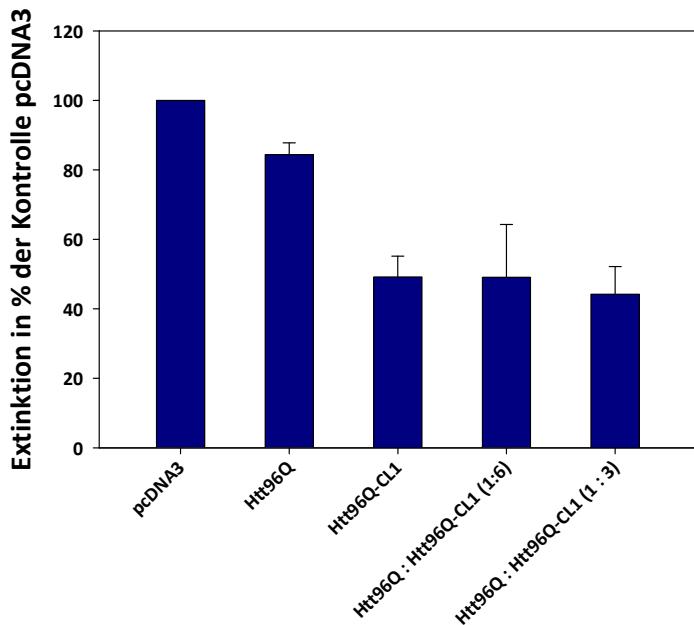
Htt96Q-CL1 (51 % Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle) erwies sich

zytotoxischer als Htt96Q und auch Htt20Q, welche mit 98 % bzw. 94 % Zellviabilität der Kontrolle fast keine Zytotoxizität aufwiesen. Dagegen zeigte Htt20Q-CL1 mit 83 % Zellviabilität der Kontrolle ebenfalls eine gewisse Toxizität. Eine veränderte Zellmorphologie, wie sie bei den mit *de novo* amyloiden Proteinen exprimierenden Zellen auftrat, wurde bei den mit Htt-Konstrukten transfizierten Zellen nicht nachgewiesen.

### 4.3.9 Coexprimierte Htt96Q kann die Zytotoxizität von Htt96Q-CL1 verringern

Die erhöhte Zytotoxizität von Htt96Q-CL1 gegenüber Htt96Q könnte viele Ursachen haben, z.B. verstärkte Inhibition des UPS oder erhöhte Solubilität des Htt96Q-CL1. Eine Verringerung der Zytotoxizität des Htt96Q-CL1 ohne das CL1-Degron zu entfernen oder Aminosäuren zu substituieren könnte einerseits durch Induktion molekularer Chaperone erfolgen, welche die toxischen Spezies eventuell abschirmen, durch Induktion des UPS oder durch den Einsatz von stärker aggregierenden Proteinen, welche die löslichen, wahrscheinlich toxischen Spezies abfangen und eventuell inkorporieren. Die Induktion molekularer Chaperone wurde insofern als problematisch angesehen, als dass dadurch auch eine Lancierung des Htt96Q-CL1 hin zum Proteasom begünstigt werden könnte, was die Zytotoxizität auch verstärken könnte. Daher wurde entschieden, Htt96Q-CL1 mit Htt96Q zu coexprimieren. Es wurde zuerst mit geringen Mengen cotransfiziertem Htt96Q versucht, die

Zytotoxizität von Htt96Q-CL1 zu senken (s. Abb. 4.112). Verhältnisse von Htt96Q : Htt96Q-CL1 = 1:6 oder 1:3 führten zu keiner Erhöhung der Zellviabilität, im Gegenteil, sie erniedrigte sich noch um ca. 10 %. Es wurde dann versucht mit weiteren Titrationsexperimenten des Htt96Q die Zellviabilität von Zellen, transfiziert mit Htt96Q-CL1, zu erhöhen.

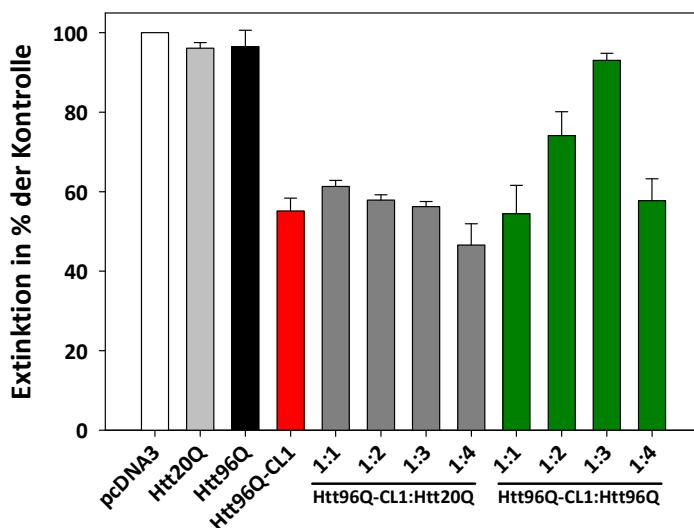


**Abb. 4.112:** Geringe Mengen an transfiziertem Htt96Q können die Zytotoxizität von Htt96Q-CL1 nicht aufheben.

HEK293T-Zellen wurden entweder mit 30 µg Htt96Q oder Htt96Q-CL1 alleine, oder in einer Kombination transfiziert: 5 µg Htt96Q und 30 µg Htt96Q-CL1 (1:6) oder 10 µg Htt96Q und 30 µg Htt96Q-CL1 (1:3). Die anderen Transfektionen, auch die der Kontrolle (pcDNA3) wurden soweit mit pcDNA3 aufgefüllt, dass stets insgesamt 40 µg Plasmid transfiziert bzw. cotransfiziert wurden. Drei Tage später wurde von 250.000 ausgesäten Zellen ein MTT-Test durchgeführt.

Dabei mussten große Mengen an konzentrierten Htt96Q-Plasmiden

transfiziert werden, um einerseits die Menge an 30 µg Htt96Q-CL1-Plasmid zu erhalten, welche zu der beobachteten Zytotoxizität führte, andererseits um mehr Htt96Q-Plasmid in die Zellen parallel zu Htt96Q-CL1 einzubringen.



**Abb. 4.113:** Große Mengen überexprimiertem Htt96Q reduzieren die durch Htt96Q-CL hervorgerufene Zytotoxizität.

HEK293T-Zellen wurden entweder mit 30 µg Htt20Q, Htt96Q oder Htt96Q-CL1 allein transfiziert, oder in einer Kombination: 30 µg Htt20Q/Htt96Q und 30 µg Htt96Q-CL1 (1:1); oder 60 µg Htt20Q/Htt96Q und 30 µg Htt96Q-CL1 (2:1); oder 90 µg Htt20Q/Htt96Q und 30 µg Htt96Q-CL1 (3:1); oder 120 µg Htt20Q/Htt96Q und 30 µg Htt96Q-CL1 (4:1). Die anderen Transfektionen, auch die der Kontrolle (pcDNA3) wurden soweit mit pcDNA3 aufgefüllt, dass stets insgesamt 140 µg Plasmid transfiziert bzw. cotransfiziert

wurden. Drei Tage später wurde von 250.000 ausgesäten Zellen ein MTT-Test durchgeführt.

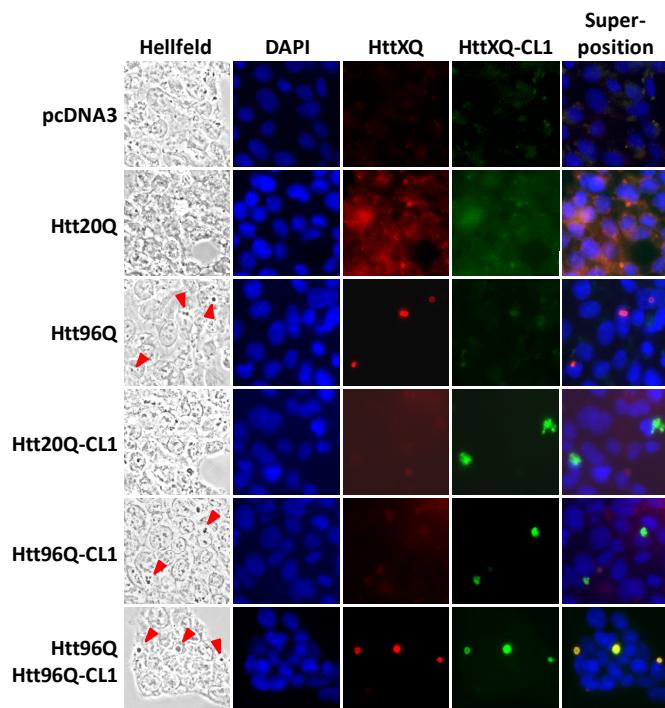
Die Zytotoxizitäten der allein transfizierten Konstrukte Htt20Q, Htt96Q und Htt96Q-CL1 entsprachen in etwa denen der zuvor durchgeführten Experimente (Abb. 4.111). Cotransfektionen von Htt96Q-CL1 mit steigenden Mengen an Htt20Q ergaben keine

signifikante Reduktion der Zytotoxizität. Dagegen ergaben steigende Mengen an Htt96Q eine starke Verringerung der Zytotoxizität (s. Abb. 4.113). Bei der Titration ergab sich eine Kurve mit einem Optimum der Konzentrationen von Htt96Q = 90 µg, Htt96Q-CL1 = 30 µg, dies entspricht dem Verhältnis in der obigen Abbildung von 3:1. Eine weitere Erhöhung der Htt96Q-Menge auf 120 µg führte wieder zu einer starken Erniedrigung der Zellviabilität auf ca. 58 %. Durch starke Überexpression des Htt96Q im Verhältnis zu Htt96Q-CL1 von 3:1 konnte die Zytotoxizität auf ca. 16 % begrenzt werden, was einer Zellviabilität von 84 % entsprach. Damit war es möglich, die Zytotoxizität des löslicheren Htt96Q-CL1 mit Hilfe der Überexpression von Htt96Q zu kompensieren.

Somit ist das stärker aggregierende Htt96Q in der Lage, die durch das löslichere Htt96Q-CL1 verursachte Toxizität zu verringern.

#### 4.3.10 Aggregate des Htt96Q und Htt96Q-CL1 colokalisieren

Htt96Q war, in hohen Mengen produziert (viele Zellen transfiziert), in der Lage, die Zytotoxizität des Htt96Q-CL1 zu senken. Denkbar wäre, dass dies durch einen indirekten Effekt (z.B. Behinderung des gezielten Abbaus durch das UPS) hervorgerufen wurde, wahrscheinlicher ist jedoch ein direkter Effekt der beiden PolyQ beinhaltenden Proteine.



**Abb. 4.114: Htt96Q- und Htt96Q-CL1-Aggregate colokalisieren.**

HEK293T-Zellen wurden mit 30 µg jeden Plasmids der entsprechenden Konstrukte transfiziert, ebenso die Cotransfektion mit Htt96Q und Htt96Q-CL1. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit 1 % PBS-B blockiert. Die Proben HttXQ waren Myc-markiert, die Proben für HttXQ-CL1 mit einem HA-Tag versehen, so dass die Proben HttXQ mit einem polyklonalen α-Myc-Ak aus dem Kaninchen detektiert werden konnten (sekundärer Ak: α-Kaninchen-Cy3) und die Proben HttXQ-CL1 mit einem monoklonalem Ak gegen HA aus der Maus (sekundärer Ak: α-Maus-FITC). Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss der Abteilung gemacht (Objektiv: 63x). Es wurde hier bewusst ein Bildausschnitt gewählt, in welchem Zellen mit Htt96Q und Htt96Q-CL1 cotransfiziert worden waren.

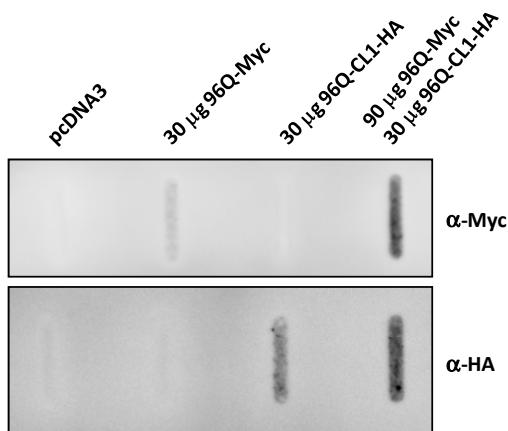
Daher wurden die Proteine, mit unterschiedlichen Markierungen versehen (Myc-Tag und HA-Tag), cotransfiziert und die Lokalisierung der Aggregate *via* indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Abb. 4.114 zeigt, dass Htt96Q und Htt96Q-CL1 tatsächlich colokalisierten. Wieder

zeigten Htt96Q größere, scharf umrissene Aggregate im perinukleären Raum, Htt96Q-CL1 im Schnitt etwas kleinere, jedoch auch scharf umrissene Aggregate im perinukleären Bereich. Genau dieses Bild fand man auch bei cotransfizierten Zellen, wo eine starke Colokalisation der Aggregate von Htt96Q und Htt96Q-CL1 zu verzeichnen war, die Aggregate waren quasi eins. Im Schnitt schienen hier die Aggregate von Htt96Q-CL1 etwas größer zu sein als die Aggregate des Htt96Q, möglicherweise war das Htt96Q-CL1-Material konzentrisch um Htt96Q angeordnet. Htt20Q war wie erwartet homogen über die Zelle verteilt, mit Präferenz im Zytoplasma, während 20Q-CL1 diffuse aggregat-ähnliche Strukturen ausbildete, jedoch wesentlich ausgedehnter als die Aggregate von Htt96Q und Htt96Q-CL1.

Coexpression von Htt96Q und Htt96Q-CL1 resultierte somit in einer klaren Colokalisation der Proteine in Aggregaten.

#### 4.3.11 Htt96Q-CL1 wird in SDS-unlösliche Htt96Q-Aggregate rekrutiert

Die Colokalisation zwischen Htt96Q und Htt96Q-CL1 gab bereits einen Hinweis auf mögliche direkte Interaktionen zwischen Htt96Q und Htt96Q-CL1. Ein weiteres starkes Indiz für eine wahrscheinliche direkte Interaktion zwischen Htt96Q und Htt96Q-CL1 gab eine biochemische Analyse der Zelllysate mit cotransfizierten Konstrukten. Um Rekrutierung des löslicheren Htt96Q-CL1 in die unlöslicheren Htt96Q-Aggregate nachzuweisen, wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden, unterschiedlichen markierten (Myc-Tag und HA-Tag) Konstrukten transfiziert und nach Lyse der Zellen ein Filterretardationstest durchgeführt.

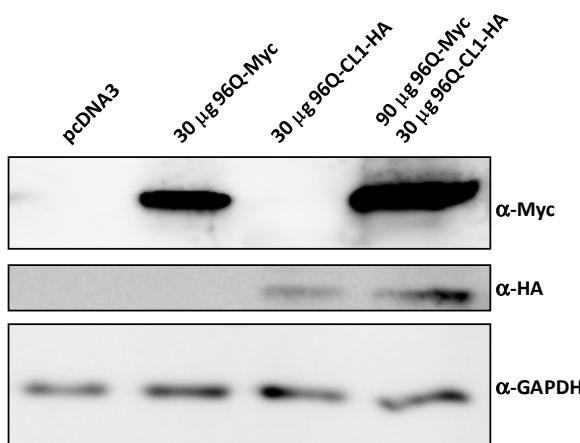


**Abb. 4.115: Htt96Q-CL1 wird in Htt96Q-Aggregate rekrutiert.**

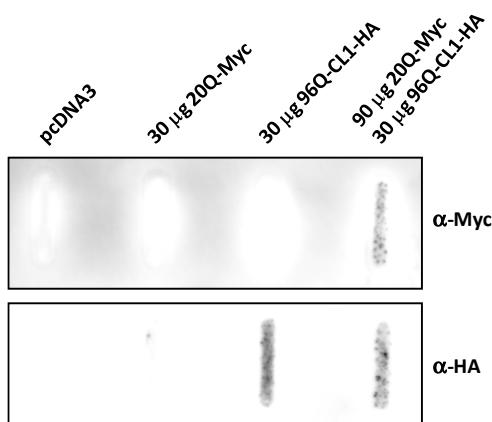
HEK293T-Zellen wurden mit dem leeren Vektor pcDNA3, mit 30 µg Myc-Htt96Q oder 30 µg HA-Htt96Q-CL1 transfiziert bzw. mit 30 µg HA-Htt96Q-CL1 und 90 µg Myc-Htt96Q cotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert und nach 1 h mit final 2 % SDS versetzt. Die Lysate wurden parallel in gleichen Mengen auf zwei Zelluloseacetatfilter der Porenweite 0,2 µm aufgetragen und mit α-Myc und α-HA dekoriert und entwickelt.

Der Filterretardationstest in Abb. 4.115 zeigte ein verstärktes Signal von Htt96Q-CL1 in Anwesenheit von Htt96Q, obwohl gleiche Mengen Htt96Q-CL1 (30 µg) transfiziert worden waren. Das Signal von cotransfiziertem Htt96Q war ebenfalls stärker als von allein transfiziertem Htt96Q, was jedoch damit zusammenhängt, dass die dreifache Menge transfiziert wurde, um wieder möglichst viele Htt96Q-CL1 exprimierende Zellen zu erreichen. Der korrespondierende Western Blot (Abb. 4.116) zeigt

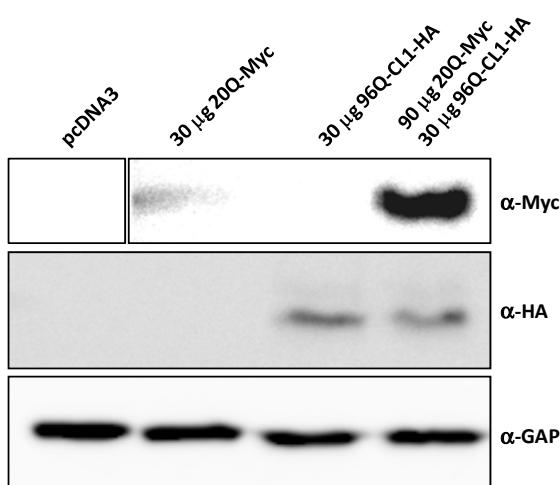
eine deutlich größere Menge an exprimiertem löslichem Htt96Q, was mit der größeren Menge an transfiziertem Plasmid korrelierte.



Filterretardationstest durchgeführt (s. Abb. 4.117).



durch coexprimierte Htt20Q vermehrt in Aggregate rekrutiert. Dagegen wurde Htt20Q, was seinerseits allein transfiziert löslich ist und nicht im Filter retardiert wird, bei Coexpression von Htt96Q-CL1 im Filter zurückgehalten.



**Abb. 4.116: Expressionslevel der Proteine Htt96Q und Htt96Q-CL1.**

Zum korrespondierenden Filterretardationstest (s. Abb. 4.115) wurde ein Western Blot mit  $\alpha$ -Myc- und  $\alpha$ -HA-Aks durchgeführt.

Die exprimierte lösliche Menge an Htt96Q-CL1 war bei der Coexpression nur leicht erhöht. Zu Kontrollzwecken wurde ein analoger Versuch mit Htt20Q im

**Abb. 4.117: Htt20Q führt nicht zu einer vermehrten Rekrutierung von Htt96Q-CL1 in Aggregate, wird jedoch selbst in Anwesenheit von Htt96Q-CL1 retardiert.**

HEK293T-Zellen wurden mit dem leeren Vektor pcDNA3, mit 30 µg Myc-Htt20Q oder 30 µg HA-Htt96Q-CL1 transfiziert bzw. mit 30 µg HA-Htt96Q-CL1 und 90 µg Myc-Htt20Q cotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert und nach 1 h mit final 2 % SDS versetzt. Die Lysate wurden parallel in gleichen Mengen auf zwei Zelluloseacetatfilter der Porenweite 0,2 µm aufgetragen und mit  $\alpha$ -Myc und  $\alpha$ -HA dekoriert und entwickelt.

Im Kontrollexperiment wurde Htt96Q-CL1 nicht

durch coexprimierte Htt20Q vermehrt in Aggregate rekrutiert. Dagegen wurde Htt20Q, was seinerseits allein transfiziert löslich ist und nicht im Filter retardiert wird, bei Coexpression von Htt96Q-CL1 im Filter zurückgehalten.

**Abb. 4.118: Expressionslevel Htt20Q und Htt96Q-CL1 im Western Blot.**

Zum korrespondierenden Filterretardationstest (s. Abb. 4.117) wurde ein Western Blot mit  $\alpha$ -Myc- und  $\alpha$ -HA-Aks durchgeführt. Die Kontrolle ( $\alpha$ -HA) wurde noch einmal mit einer separaten SDS-PAGE und Western Blot aufgenommen.

Der Kontrollblot des Kontrollexperimentes Htt20Q/Htt96Q-CL1 verdeutlicht, dass Htt96Q-CL1 in gleichen Mengen exprimiert wurde (s. Abb. 4.118).

Zusammengenommen wurde durch

Coexpression von Htt96Q und Htt96Q-CL1 mehr Htt96Q-CL1-Protein in Aggregate rekrutiert, was mit Htt20Q nicht der Fall war.

## 5. Diskussion

Die korrekte Faltung von Proteinen ist eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen und bedingt zusammen mit der Proteinbiogenese und -degradation die Proteostase in Zellen. Molekulare Chaperone helfen bei der Faltung von Proteinen und verhindern Proteinfehlfaltung und Aggregation. Fehlfaltende Proteine, wie sie in Amyloidosen und insbesondere einigen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, können zur Bildung von fibrillären Aggregaten mit Kreuz- $\beta$ -Strukturen führen, welche als amyloid oder amyloid-ähnlich bezeichnet werden. Die Proteinfehlfaltung resultiert in zytotoxischen Effekten, wobei noch nicht abschließend geklärt wurde, ob Monomere, Oligomere, Aggregate oder eine Kombination dieser Spezies die Zytotoxizität bedingen. Ist die Kapazität des Chaperon-Netzwerkes durch stark fehlfaltende Proteine überschritten, dürften diese vermehrt mit anderen Komponenten der zellulären Proteinqualitätskontrolle interferieren, was die Proteinfehlfaltung verstärken könnte.

Ein Disput besteht zudem, ob oder zu welchem Anteil die Zytotoxizität durch Aggregation des fehlgefalteten Proteins selbst resultiert, oder inwieweit auf einem Funktionsverlust, bedingt durch Fehlfaltung und Aggregation.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues zelluläres, artifizielle Proteine exprimierendes Modellsystem etabliert, um die strukturellen Determinanten zytotoxischer amyloider oder amyloid-ähnlicher Proteine zu analysieren; zudem wurde expandiertes amyloides Huntingtin und seine modifizierte Versionen, sowie durch Inkorporation von As-Analoga fehlgefaltete Proteine untersucht.

Drei aus einer kombinatorischen Bibliothek ausgewählte *de novo* amyloide Proteine,  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23, sowie ein  $\alpha$ -helikales Protein  $\alpha$ S824 wurden herangezogen, um deren Eigenschaften dieser nicht durch die Evolution an lebende Organismen adaptierte Proteine in mammalischen Zellen zu untersuchen. Expression der *de novo* generierten  $\beta$ -Faltblattproteine resultierte in der Bildung von amyloiden Aggregaten in Zellen und einer Zytotoxizität mit der Gradierung  $\beta$ 4 <  $\beta$ 17 <  $\beta$ 23. Mit ähnlicher Gradierung wurden apoptotische Ereignisse in den Zellen registriert, das Auftreten oligomerer präfibrillärer Spezies, die Inhibition der Rückfaltung von GFP-Luciferase, sowie eine Suppression der HSR. Zudem korrelierte die Abstufung der durch die *de novo* amyloiden Proteine verursachte Zytotoxizität mit Anzahl und Eigenschaften aberranter Proteininteraktionen. Das Interaktom der *de novo* amyloiden Proteine besitzt eine relativ große Molmasse, große strukturelle Flexibilität und ist reich an

IURs. Die Interaktionen können mit den spezifischen strukturellen Eigenschaften der Interaktoren erklärt werden und haben das Potential, verschiedene zelluläre Schlüsselfunktionen wie Translation, Aufrechterhaltung des Zytoskeletts und Proteinqualitätskontrolle auszuschalten, einschließlich der protektiven HSR. Die amyloiden *de novo* Proteine interagieren mit einem metastabilen Subproteom und verursachen dabei eine multifaktorielle Zytotoxizität. Das molekulare Chaperon Hsp110 konnte die Zytotoxizität von  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 partiell aufheben sowie die Proteine in löslicher Form halten.

Das Prolin-Analogon Azetidin-2-carbonsäure führte in Anwesenheit eines proteasomalen Inhibitors zur Verstärkung der Zytotoxizität in mammalischen Zellen, es entstanden amyloide Aggregate und präfibrilläre Intermediate, so dass die Hypothese der Verstärkung von Funktion und Pathogenität durch Aggregation in diesem System weiter unterstützt wurde.

Zusammen mit dem Ergebnis, dass Coexpression des schwerlöslichen Htt96Q zu einer Reduktion der Zytotoxizität des löslicheren Htt96Q-CL1 führte, werden durch diese Resultate die Hypothesen, dass löslichere Formen und speziell präfibrilläre Oligomere die toxische Spezies in einem gain-of-function-Geschehen darstellen, wobei ein metastabiles Interaktom in multifaktorieller Weise zu den deletären und zytotoxischen Ereignissen in den Zellen führt, unterstützt.

## 5.1 *De novo* $\beta$ -Faltblattproteine als Modell für amyloide Proteine

### 5.1.1 Physiko-chemische Eigenschaften und Homologien der *de novo* generierten Proteine

Wie in der Einleitung und unter Ergebnisse bereits erwähnt, wurden die *de novo* amyloiden Proteine als Modellproteine ausgewählt, weil sie keine durch die Evolution hervorgebrachte biologische Funktion aufweisen und damit die deletären Folgen amyloider Aggregation *per se* untersucht werden können. Es konnten keine Homologien zu bestehenden humanen Proteinen nachgewiesen werden, so dass sich diese Proteine für eine solche Untersuchung, wo nur die Aggregation als solche eine Rolle spielt, eignen sollten. Andererseits kann durch fehlende Homologie zu anderen natürlichen Proteinen eine mögliche Funktion nicht ausgeschlossen werden. So wie es viele Beispiele für chemisch synthetisierte oder molekularbiologisch generierte Wirkstoffe gibt, welche auf den ersten Blick keine Ähnlichkeiten zu natürlich in den Zellen auftretenden Molekülen zeigen, jedoch auf die Zellen und damit auf zelluläre

Komponenten wirken, so können auch spezifische Wirkmechanismen dieser artifiziellen Proteine auf zelluläre Komponenten nicht ausgeschlossen werden.

Homologien der *de novo* amyloiden Proteine untereinander sind erwartungsgemäß vorhanden, da sie nach dem gleichen Muster entworfen wurden. Interessant in diesem Zusammenhang ist die nähere Verwandtschaft zwischen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 als zwischen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 23 bzw.  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23. Dies könnte sich auch in den verschiedenen Zytotoxizitäten widerspiegeln, der graduellen Auf trennung von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23, obwohl sie annähernd die gleiche Molmasse besitzen und anderen beschriebenen Ähnlichkeiten, insbesondere die Fähigkeit von Hsp110, die Zytotoxizität von  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 etwas zu reduzieren, nicht jedoch die von  $\beta$ 23. Eventuell könnten viele dieser Effekte mit einer höheren Hydrophobizität von  $\beta$ 23 zusammenhängen.  $\beta$ 23 besitzt wegen seines hohen Isoleucinanteils auch die meisten verzweigten Aminosäurereste; Isoleucin weist sowohl nach Kyte-Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) mit 4,5 als auch nach der Eisenberg-Consensus-Skala (ECS) mit 1,4 (Eisenberg, 1984) den höchsten (positiven) Hydropathieindex unter den 20 proteinogenen As auf. Dies könnte eine erhöhte Adhärenz des  $\beta$ 23 an verschiedene andere Proteine erklären, insbesondere solche, bei welchen ebenfalls viele hydrophobe Reste zugänglich sind, sei es durch ihre native Struktur, durch lange IURs oder durch induzierte Fehlfaltung bedingt.

### 5.1.2 Expression der *de novo* generierten Proteine in humanen Zellen

Sowohl *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine als auch die  $\alpha$ -helikalen Proteine wurden in mammalischen Zellen exprimiert und ließen sich im Western Blot (s. Abb. 4.5 und 4.6), Dot Blot (z.B. Abb. 4.19) und Slot Blot (Abb. 4.8) gut detektieren. Die  $\beta$ -Faltblattproteine wurden meistens in geringeren Mengen exprimiert als die  $\alpha$ -helikalen Proteine, mit Ausnahme des Proteins  $\alpha$ n86 der ersten Generation, was wahrscheinlich auf eine Autoinhibition ihrer Proteinbiogenese zurückzuführen ist. Generell üben die *de novo* amyloiden Proteine eine inhibitorische Wirkung auf die Proteinbiogenese aus, wie z.B. in Abb. 4.30 bei coexprimierten Proteinen und 4.39 bei endogenen Proteinen gezeigt. Daher entspricht das Muster der Mengen der Proteinexpression auch häufig der bei der Zytotoxizität beobachteten Gradierung (s. Abb. 4.15). Da die  $\alpha$ -helikalen Proteine bei HEK293T-Zellen und N2a-Zellen nur eine sehr geringe Zytotoxizität hervorrufen, ist es vor diesem Hintergrund verständlich, dass hier auch mehr Protein exprimiert wird. Es ist denkbar, dass die verminderten Mengen an amyloidem Protein auch auf eine vermehrte Degradation zurückzuführen sind, doch wurde hier gezeigt (s. Abb. 4.25 und 4.26), dass keine Akkumulation durch proteasomale und

autophageale Inhibition stattfand, so dass alles für eine verminderte Proteinbiosynthese dieser Proteine spricht. Die beiden  $\alpha$ -helikalen Proteine  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836 wurden vermutlich aus diesen Gründen stärker als die  $\beta$ -Proteine exprimiert, nicht jedoch das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ n86 der ersten Generation. Die niedrigen Signale im Western Blot sind kongruent mit nur wenigen Zellen in der Fluoreszenz-Mikroskopie, welche dieses Protein exprimieren. Eine Analyse des proteasomalen Abbaus dieses Proteins mit Hilfe des proteasomalen Inhibitors MG132 ergab, dass nach Zugabe dieses Inhibitors eine starke Akkumulation stattfand (s. Abb. 4.28). Dies bedeutet, dass das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ n86 instabiler ist als die beiden anderen untersuchten  $\alpha$ -helikalen Proteine der zweiten Generation  $\alpha$ S824 und  $\alpha$ S836 und bevorzugt über das UPS degradiert wird. Dies stimmt mit zuvor publizierten Ergebnissen überein, dass die kurzen *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteine instabile, fluktuierende Strukturen aufweisen (Roy et al., 1997; Rosenbaum et al., 1999; Roy und Hecht, 2000). Dies war auch mit der Grund, warum ausgehend von dieser ersten Generation  $\alpha$ -helikaler *de novo* designer Proteine eine zweite Generation entworfen und produziert wurde, die diesmal 102 As-Reste umfasste (Wei et al., 2003b). Diese Proteine erwiesen sich im NMR als stabiler und nativ-ähnlicher (Wei et al., 2003a; Go et al., 2008). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die Instabilität dieser Proteine der ersten Generation für eine schnelle Degradierung durch das UPS sorgt, möglicherweise erfolgt auch hier die Erkennung der instabilen Struktur durch molekulare Chaperone.

Eine weitere Auffälligkeit der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine ist ihr unterschiedliches Laufverhalten bei der SDS-PAGE bzw. nachfolgendem Western Blot. Wie unter Abb. 4.5 und 4.6 gezeigt, laufen die  $\alpha$ -helikalen Proteine bei ihren erwarteten apparenten Molmassen, das Laufverhalten der  $\beta$ -Proteine, welche alle bei ca. 9 kDa laufen sollten, unterscheidet sich beträchtlich. Nur das *de novo* amyloide Protein  $\beta$ 23 läuft annähernd bei der berechneten Molmasse,  $\beta$ 17 besitzt demnach eine apparente Molmasse von 13 kDa und  $\beta$ 4 von 17 kDa. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt wahrscheinlich auch in der Hydrophobizität der Proteine und in deren Ladung.  $\beta$ 23 ist demnach sowohl das hydrophobste als auch das *de novo* amyloide Protein mit der höchsten negativen Nettoladung. SDS kann sich wahrscheinlich besser an hydrophobe Strukturen anlagern (Lin et al., 1999), so dass hiermit eine höhere negative Ladung erreicht wird, additiv zu der bereits erhöhten negativen Nettoladung des Proteins selbst. Eine Änderung dieses generellen Laufverhaltens erbrachten lediglich die Prolinmutanten (s. Abb. 4.74); durch Substitution zweier Glycinreste durch Prolin im mittleren Turn der  $\beta$ -Proteine liefen alle drei Mutanten  $\beta$ 4P,  $\beta$ 17P und  $\beta$ 23P auf

gleicher Höhe bei  $\beta 4$ . Möglicherweise wurde durch die Substituenten das Packungsverhalten der Proteine und damit deren Konformation in der SDS-PAGE dermaßen verändert, dass entweder SDS schlechter an  $\beta 17P$  und  $\beta 23P$  binden kann und/oder die Moleküle durch ihre veränderte Größe langsamer durch das Polyacrylamidgel wandern.

Bei den  $\alpha$ -helikalen Proteinen finden sich, wenn die Membran lange exponiert wird, Banden oberhalb der Hauptbanden, besonders im Falle des  $\alpha$ -helikalen Proteins  $\alpha n86$ . Eventuell könnten diese Banden ubiquitinierten und polyubiquitinierten Spezies zugeordnet werden, da die Unterschiede ca. 8,5 kDa betragen.

Banden oberhalb der Hauptbanden traten im Falle der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine nur auf, wenn die Lyse ohne reduzierendes Agens erfolgte (s. Abb. 4.7). Hier handelt es sich wahrscheinlich nicht um ubiquitinierte Spezies, sondern Oligomere der aggregierenden Proteine. Auch diese zeigten in der SDS-PAGE das unterschiedliche Laufverhalten. Viele aggregierende Proteine zeigen auch in der SDS-PAGE die Bildung von Dimeren oder höheren Oligomeren, z.B. das A $\beta$ -Peptid oder  $\alpha$ -Synuklein (Quist et al., 2005), so dass dieser Befund bereits einen Hinweis auf die Aggregationsneigung der *de novo* generierten  $\beta$ -Faltblattproteine gab.

### 5.1.3 *De novo* $\beta$ -Faltblattproteine bilden amyloide Aggregate und präfibrilläre Oligomere in humanen Zellen

Die Aggregationsfähigkeit der *de novo* generierten  $\beta$ -Faltblattproteine wurde im humanen Zellkulturmodell der HEK293T-Zellen mit mehreren Methoden nachgewiesen. Sowohl mit biochemischen (Filterretardationstest, s. Abb. 4.8; Ultrazentrifugation, s. Abb. 4.10) als auch mit Hilfe von zellbiologischen Methoden (s. Abb. 4.12) wurde hier das erste Mal in humanen Zellen nachgewiesen, dass diese Proteine *in vivo* aggregieren, was die *in vitro*-Ergebnisse von West et al., 1999 bestätigt. Die Filtergröße der Zelluloseactetatmembran für den Filterretardationstest beträgt 0,2  $\mu$ m, was bedeutet, dass die Aggregate größer sein müssen. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass die Aggregate jedoch im Vergleich zu PolyQ-Aggregaten (z. B. Abb. 4.109) und den Aggregaten der forcierteren Aggregation durch das Prolin-Analogon Azc (Abb. 4.95) recht klein und willkürlich über die Zelle verteilt zu sein scheinen, wobei jedoch eine gewisse Präferenz für den perinukleären Raum besteht. Ein Unterschied in der Größe der Aggregate zwischen den drei verschiedenen Proteinen  $\beta 4$ ,  $\beta 17$  und  $\beta 23$  scheint hiernach nicht vorzuliegen, dies zeigen auch die Ergebnisse der Ultrazentrifugation und des Filterretardationstests, wo annähernd gleiche

Mengen aggregierten Materials in allen drei Fällen erhalten wurde. Ein Unterschied zu den PolyQ-Aggregaten und den Aggregaten, welche durch den Zusatz von Azc erhalten wurden, ist außerdem ihre Unregelmäßigkeit. Während die Aggregate der *de novo* amyloiden Proteine sehr unregelmäßige und teilweise zerklüftete Oberflächen aufweisen, ist die Oberfläche der Aggregate bei PolyQ-Proteinen oder nach Azc-Behandlung rund und gleichmäßiger. Noch etwas anderes unterscheidet die Aggregate der *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteine von den PolyQ-Aggregaten: Sie sind nicht SDS-resistent (s. Abb. 4.8). Dies alles spricht für eine andere Natur der Aggregate, möglicherweise spielt hier die Hydrophobizität der Proteine eine größere Rolle als bei den Aggregaten des expandierten Hts.

Gegenüber den *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen aggregieren die *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteine nicht, und zwar alle drei hier untersuchten  $\alpha$ S824,  $\alpha$ S836 und  $\alpha$ n86, was mit den *in vitro*-Untersuchungen übereinstimmt. In der Ultrazentrifugation findet sich nahezu das gesamte Material im löslichen Überstand, sie werden im Filterretardationstest kaum zurückgehalten und sind homogen über das Zytoplasma der Zellen verteilt, was ebenfalls mit den *in vitro*-Ergebnissen übereinstimmt, welche von Kamtekar et al., 1993, Wei et al., 2003 und Go et al., 2008 erhalten wurden. Während im Falle der  $\beta$ -Faltblattproteine die Aggregate in einigen Fällen mit dem Nukleus colokalisierten, waren die  $\alpha$ -helikalen Proteine nur im Zytoplasma der Zellen zu finden. Da den Sequenzen eine NLS- oder NES-Sequenz fehlt, sollten sie, wenn sie nicht als ein unspezifisches Cargoprotein in den Kern transportiert werden, nur aufgrund ihrer geringen Größe in den Nukleus diffundieren (Wang et al., 2007). Mit Hilfe des für amyloide Strukturen spezifischen NIAD-4-Farbstoffes wurde zudem nachgewiesen, dass Aggregate von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 amyloider Natur sind, während in mit  $\alpha$ S824 transfizierten Zellen keine solchen NIAD-4-positiven Strukturen nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 4.14). Auch diese Befunde bestätigen die *in vitro*-Ergebnisse von West et al., 1999, die zeigten, dass die  $\beta$ -Faltblattproteine *in vitro* für amyloide Strukturen spezifische diagnostische Farbstoffe binden.

Mittels Gelfiltration getrennte native Zellextrakte mit exprimierten *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen ergaben eine Reaktivität mit dem A11-Antikörper (Kayed et al., 2003), welcher präfibrilläre oligomere Strukturen erkennt (s. Abb. 4.19). Wie im Ergebnisteil 4.1.9 erwähnt, war es nicht möglich, eine unterschiedliche A11-Reaktivität in nicht-fraktionierten nativen Zelllysaten nachzuweisen, es gab immer eine starke Hintergrundreaktion der Kontrolllysate. Es könnte sein, dass in den Zellen bereits A11-reaktives Material vorliegt, was das additive Signal der *de novo* amyloiden Proteine überlagert. Es könnte jedoch auch sein,

dass im nativen, nicht-fraktionierten Lysat die A11-reaktiven präfibrillären Spezies durch andere Moleküle maskiert vorliegen, möglicherweise auch durch anderere Aggregatformen während des Aggregationsprozesses, welche erst nach einer Gelfiltration separiert wurden. Das gleiche Bild zeigte sich in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem A11-Antikörper (Daten nicht gezeigt), hier wurde ebenfalls kein Unterschied detektiert, jedoch nach Auf trennung per Größenausschlusschromatographie.

Die Größe der Aggregate lag in der Gelfiltration zwischen 2000 und 232 kDa, so dass demnach ca. 20 bis 200 Moleküle pro präfibrillärem Intermediat vorlagen. Ähnliche Größenverhältnisse ergaben auch die Gelfiltration der Proben, welche mit dem Prolinanalogen Azc und MG132 behandelt worden waren, so dass anscheinend die Größe der vom A11-Ak erkannten präfibrillären Oligomere ungeachtet ihrer Zusammensetzung in den verwendeten humanen HEK293T-Zellen ähnlich ist.

Die Intensität der A11-Signale, insbesondere wenn sie auf die korrespondierenden Signale der *de novo* Proteine ( $\alpha$ -Myc-Ak) normalisiert wurden, korrelieren sehr gut mit den für die *de novo* Proteine beobachteten Intensitäten:  $\beta23 > \beta4+23F > \beta4 >> \alpha S824$ . Offenbar bilden die zytotoxischeren Proteine auch vermehrt präfibrilläre Strukturen, wobei auch der zusätzliche Strang von  $\beta23F$  an Protein  $\beta4$  ( $\beta4+23F$ ) zu einer vermehrten Bildung präfibrillärer Strukturen führt. Möglicherweise beschleunigt der zusätzliche  $\beta$ -Strang die Aggregation auf diesem Weg, was eventuell mit einer zeitabhängigen Analyse untersucht werden könnte.

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wurde nur bei  $\beta23$  eine angereicherte Fraktion mit niedrigerer Molmasse, im Vergleich zu den beiden weniger toxischen Proteinen  $\beta4$  und  $\beta17$  (s. Abb. 4.18) gefunden. A11-Signale konnten hier jedoch nicht nachgewiesen werden, wahrscheinlich weil die Verdünnung der Probe (in 12 ml statt im Vergleich 2,4 ml bei der Gelfiltration) zu groß war. Möglicherweise könnte es sich bei diesen niedermolekularen Spezies von  $\beta23$  ebenfalls um die toxischen Intermediate handeln, eventuell sind diese mit den amorphen Aggregaten assoziiert, die bei *in vitro* Experimenten nachgewiesen wurden (West et al., 1999; Andreas C. Wörner, unveröffentlichte Ergebnisse). In Fraktion 15 trat stets ein hoher Peak aller *de novo* amyloiden Proteine auf, wahrscheinlich handelt es sich hier um die Aggregate, welche die ebenfalls beobachteten hohen Schwankungen in der Menge auslösen, was sich in den großen Standardabweichungen bemerkbar macht.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die toxischen Proteine andere Proteine in den Zellen ebenfalls zur Fehlfaltung bringen und diese damit eventuell auch präfibrilläre Spezies

bilden könnten, möglicherweise in einer Art Schneeballeffekt. Diese induzierte strukturelle Konversion anderer Moleküle durch die überexprimierten *de novo* amyloiden Proteine könnte auf einen Prioneneffekt hindeuten, auf andere Moleküle in der Zelle ausgedehnt. Bevorzugt metastabile Proteine, Proteine mit bereits unstrukturierten Sequenzen, könnten als Interaktionspartner anfällig für eine solche strukturelle Änderung verbunden mit der Bildung präfibrillärer Formen sein (Chien et al., 2003). Diese Hypothese wird durch die unter 5.1.9 diskutierten erhaltenen Daten zum Interaktom der *de novo* amyloiden Proteine weitergehend unterstützt.

Daneben korrelierte die Expression der amyloiden *de novo* Proteine auch mit dem Auftreten durch ANS anfärbbarer hydrophober Strukturen, wobei distinkte ANS gefärbte Strukturen mit Nilrot-gefärbten (färbt spezifisch Lipidtropfen) Strukturen colokalisierten (Daten nicht gezeigt). Dabei könnte es sein, dass Lipidtropfen, wie sie in geringerem Ausmaß und schwächer fluoreszierend auch in Kontrollzellen beobachtet wurden, vermehrt gebildet wurden (Outreiro und Lindquist, 2003; Welte, 2007). Möglicherweise stellen diese Lipidtropfen auch eine Möglichkeit dar, fehlfaltende Proteine, insbesondere, wenn sie eine hohe Hydrophobizität aufweisen, für die Zelle inaktiv zu halten und besäßen damit eine ähnlich protektive Funktion wie Aggresomen (Welte, 2007).

#### 5.1.4 *De novo* amyloide Proteine sind zytotoxisch und induzieren Apoptose

Die unter Methoden 3.2.3.4 beschriebenen Elektroporationsbedingungen bei den mit *de novo* Proteinen transient transfizierten HEK293T-Zellen zeigten drei Tage nach Transfektion eine stark verminderte Zytoviability, wobei eine Abstufung von  $\beta23 > \beta17 > \beta4 >> \alpha$ -helikale *de novo* Proteine bestand. Dieses Muster der Zytotoxizität findet sich bei vielen anderen Eigenschaften und Effekten, hervorgerufen durch die transfizierten *de novo* Proteine, wieder. Diese Abstufung wurde z.B., wie bereits besprochen, in der A11-Reaktivität beobachtet, bei dem Grad der Apoptose, bei der Unfähigkeit des Zelllysates im Beisein dieser Proteine GFP-Luciferase zurückzufalten, der Hydrophobizität, der verhinderten Induktion der HSR sowie in der allgemeinen Inhibition der Proteinbiogenese. Es könnte z.B. sein, dass  $\beta23$  aufgrund seiner Struktur, insbesondere seiner höheren negativen Nettoladung und der höheren Hydrophobizität schneller aggregiert und/oder mit anderen zellulären, instabilen Komponenten interagiert, was auch durch die Identifikation der Interaktionspartner in der Massenspektrometrie teilweise gezeigt wurde. Mit nur ca. 40 % der Zytoviability der Kontrolle wies  $\beta23$  einen so hohen Grad an Zytotoxizität auf, wie es in dem hier verwendeten zellulären System mit transienter Transfektion mittels Elektroporation überhaupt nur erreicht

werden könnte. Geht man davon aus, dass die Transfektionseffizienz maximal bei ca. 50 – 60 % lag (Auszählung der transfizierten Zellen, nicht gezeigte Daten), dann sollten 50 % - 40 % der Zellen nicht transfiziert sein und sich wie die Kontrolle verhalten. Vor diesem Hintergrund war die Zytotoxizität von  $\beta$ 23 dann sehr hoch. Es wird damit jedoch auch deutlich, dass in diesem System keine wesentlich niedrigeren Prozentsätze der Zellviabilität als 40 % erwartet werden können. Eine Behandlung der Zellen mit KCN (s. Abb. 5.2) wies die unteren Grenzen des MTT-Tests im Beisein von Zellen mit ca. 22 % nach, wobei hier zu berücksichtigen ist, dass alle Zellen gleichermaßen mit KCN behandelt wurden. Obwohl die respiratorische Kette hiermit unterbrochen werden sollte, waren doch genügend Reduktionsäquivalente in den Zellen vorhanden, welche MTT bis zu 22 % der Kontrolle umsetzen konnten. Zuerst wurde beschrieben, dass hauptsächlich intramitochondriale Systeme (Novikoff et al., 1961; Miller und Gunn, 1961), insbesondere Succinat, für die Reduktion des Farbstoffes verantwortlich sein und damit die Zellviabilität bedingen würden, später wurde jedoch belegt (Berridge und Tan, 1993), dass die Reduktion auch extramitochondrial stattfinden kann und NADH und NADPH die hauptsächlichen Reduktionsmittel darstellen. Die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Formazans entspricht damit eher der Glykolyserate der Zellen und ist somit weniger ein Maß für die Zellatmung. Es wurde nachgewiesen, dass die Reduktion von MTT spezifisch durch das A $\beta$ -Peptid inhibiert wird (Shearman et al., 1995), so dass dieser Test zur Messung der Zellviabilität wahrscheinlich gut die Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine und Aggregation induziert durch As-Analoga widerspiegelt.

Da das  $\alpha$ -helikale Protein nur sehr geringe Zytotoxizität im Vergleich zu den *de novo*  $\beta$ -amyloiden Proteine induzierte, lag es nahe, dass der Myc-Tag nicht für die Zytotoxizität verantwortlich ist. Um die Möglichkeit einer Beteiligung des Myc-Tags an der Zytotoxizität dennoch auszuschließen, wurden die entsprechenden Konstrukte mit Tetracystein-Tags generiert und deren Zytotoxizität gemessen (s. Abb. 4.92). Es trat dabei keine signifikante Änderung der Toxizität auf, so dass auch hier wieder die Gradierung  $\beta$ 4 <  $\beta$ 17 <  $\beta$ 23 in Bezug auf die Zytotoxizität zu Tage trat, was eine Beteiligung von verschiedenen Tags auf die zytotoxischen Eigenschaften unwahrscheinlich macht.

Die Frage, über welchen Weg sich die Zytotoxizität bemerkbar machen würde, ob Nekrose oder Apoptose, konnte ebenfalls darüber Aufschluss geben, ob es sich um einen aktiven Prozess handelt, so dass gewisse zelluläre Funktionen das Auftreten der artifiziellen Proteine erkennen, oder um einen passiven Zerfall der Zelle. Die Zytoxizität korreliert dabei mit den apoptotischen Events, dies geht auch bereits aus den mikroskopischen Bildern mit

DAPI-Färbung hervor, wo viele Nuklei von Zellen, welche die toxischen amyloiden Proteine exprimieren, kondensiert oder bereits fragmentiert vorliegen. Auch die Abrundung der Zellen und damit verbunden die Verkleinerung können ebenfalls als apoptotische Phänomene gedeutet werden. Da die Proteine exprimiert und nicht exogen zugegeben wurden, handelt es sich vermutlich um den TypII der Apoptose, den intrinsischen Weg, welcher auch bei neurodegenerativen Erkrankungen die primäre Rolle beim Sterben der Neuronen spielt (Naoi et al., 2009).

Apoptose ist ein energieabhängiger, aktiver Prozess, daher muss genügend ATP zur Verfügung stehen, um diesen ausführen zu können. Abb. 4.23 belegt, dass die Aktivität der Mitochondrien in den Zellen mit exprimierten  $\beta$ -Faltblattproteinen eingeschränkt zu sein scheint, dass jedoch eine gewisse Restaktivität vorhanden ist. Dieses Ergebnis wurde jedoch nur qualitativ aus der Beobachtung dreier voneinander unabhängig durchgeföhrter Experimente formuliert, es wurde keine weitere quantitative Analyse durchgeföhr. Es sollte in diesen Zellen also möglich sein, noch gewisse Mengen an ATP bereitzustellen, dieses könnte jedoch auch aus der Glykolyse im Zytoplasma gewonnen werden.

Eine ATP-Messung der Lysate ergab (s. Abb. 4.22), dass in Zellen, welche das *de novo* amyloide Protein  $\beta$ 23 exprimierten, sogar wesentlich mehr ATP zugegegen war, als in Zellen, welche nur mit einem leeren Plasmid transfiziert wurden oder mit dem  $\alpha$ -helikalen Protein  $\alpha$ S824, eine Analyse mit den Proteinen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 wurde nicht durchgeföhr. Dieses zunächst unerwartete Ergebnis kann jedoch Apoptose bei den *de novo* Proteinen erklären, es stünde demnach genügend ATP für apoptotische Prozesse zur Verfügung.

Zytoplasmatische ATP-Konzentrationen wurden bei mammalischen Zellen zwischen 1 und 5 mM bestimmt (Grabe und Oster, 2001; Apell et al., 1986; Storch et al., 1999). Damit liegt der ermittelte Wert der Kontrollzellen am unteren Ende dieses Bereichs mit  $1,44 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Der ATP-Wert von Zellen, welche  $\beta$ 23 exprimieren, liegt mit  $2,33 \cdot 10^{-3}$  mol/l höher. Möglicherweise kann die erhöhte ATP-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen damit begründet werden, dass die stark Energie beanspruchende Proteinbiogenese (wahrscheinlich Translation) eingeschränkt ist, so dass wenig ATP für diesen essentiellen zellulären Prozess beansprucht wird. Das ATP kann jedoch für andere zelluläre Prozesse, z.B. die Apoptose, zur Verfügung stehen. Es könnte ebenfalls sein, dass die hohen ATP-Spiegel in den Zellen durch negative Rückkopplung die Energiegewinnung der Mitochondrien einschränken, was eine verminderte Anfärbbarkeit durch den Mitotracker erklären könnte.

### 5.1.5 *De novo* amyloide Proteine ändern die zelluläre Morphologie und das Aktin-Zytosklelett

In fast allen Fällen (eine quantitative Auswertung wurde im Zusammenhang mit der Hsp110-Überexpression gemacht, s. Abb. 4.66) war die Morphologie der HEK293T-Zellen nach Transfektion mit *de novo* amyloiden Proteine *via* Elektroporation und nachfolgender Expression verändert (z.B. Abb. 4.12, 4.23 oder 4.24). Im Gegensatz zu Kontrollzellen, welche mit einem leeren Plasmid oder *de novo*  $\alpha$ -helikalen Proteinen transfiziert worden waren, erschienen die Zellen abgerundet, kleiner als die Kontrollzellen und es fehlten Filopodien. Obwohl Filopodien fehlten, oder zumindest im Mikroskop nicht sichtbar waren, blieben die Zellen adhärent, so dass sie fixiert und mikroskopisch analysiert werden konnten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zellen weniger adhärent sind und bei der Fixationsprozedur bereits ein Teil der die *de novo* amyloiden Proteine exprimierenden Zellen verloren wurden. Aus der Virologie ist der Begriff des zytopathischen Effektes (CPE, cytopathic effect) bekannt, mit Ausnahme der Synzytienbildung wurden die gleichen morphologischen Anzeichen auch hier beobachtet: Abrundung der Zellen, Herauslösung aus dem Zellverband und beginnendes Absterben. In einer Publikation von 1959 (Karzon and Bussell, 1959) wurde dieser cytopathische Effekt folgendermaßen beschrieben: „[...] the lesions were widespread by the third day and consisted of granular rounding up and fragmentation of the cells. The cells remained adherent to the glass, but eventually many were shed into the supernatant fluid.“ Diese Beobachtungen sind charakteristisch für Viren-infizierte Zellen, aber auch anderweitig zytotoxischen Substanzen ausgesetzten oder exprimierenden Zellen, wie es mit den *de novo* amyloiden Proteinen demonstriert wurde.

Mit der Änderung der Morphologie ging auch eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts einher (s. Abb. 4.24). Während in Kontrollzellen und auch in den  $\alpha$ -helikalen Protein  $\alpha$ S824 exprimierenden Zellen das Aktinzytosklett mit seinen filamentösen F- $\beta$ -Aktin voll ausgebildet war, erschien dieses bei den die *de novo* amyloiden Proteine exprimierenden Zellen deformiert, es waren keine zytoplasmatischen Filamente mehr erkennbar, sondern nur noch eine Aktincorona im äußeren Bereich. Aktin-durchzogene Filopodien waren ebenfalls nicht mehr beobachtbar, so dass insgesamt die Veränderungen der Zellmorphologie mit einer Veränderung des Aktinzytoskeletts korrelierten. Diese Befunde lassen nicht den Schluss zu, ob es sich um eine direkte Beteiligung des  $\beta$ -Aktins an der veränderten Zellmorphologie handelt oder ob andere Faktoren involviert sind.  $\beta$ -Aktin selbst wurde nicht als Interaktionspartner in der Massenspektrometrie nachgewiesen (s. Tabelle 8.7)

Anhang G), und selbst wenn es nachgewiesen worden wäre, hätte dies noch keinen Beweis für eine direkte Interaktion gegeben.

Eine Colokalisation der *de novo* amyloiden Proteine wurde mit keinem zellulären Kompartiment beobachtet, was zusätzlichen Aufschluss über eine mögliche Beteiligung intrazellulärer Strukturen mit den Proteinen gegeben hätte. Weder mit Mitochondrien, noch mit dem ER oder dem Golgi-Apparat waren Colokalisationen nachweisbar, nur in manchen Fällen traten Colokalisationen der Aggregate mit dem Nukleus auf. Eine Colokalisation mit Strukturen des ER oder Golgi-Apparates oder auch Mitochondrien scheint einerseits nicht in Betracht zu kommen, da die artifiziellen Proteine über keine entsprechenden Eintrittssequenzen verfügen. Andererseits wäre eine unspezifische Anlagerung an die Außenseiten der Kompartimente denkbar, oder ein „Schwarzfahren“ in bestimmte Kompartimente durch Adhäsion an Cargoproteine in das entsprechende Kompartiment. Zudem wurden z.B. als Interaktionspartner alle drei Subtypen des mitochondrialen VDAC nachgewiesen (s. Tabelle 8.7 Anhang G oder VDAC1 Abb. 4.56), dennoch konnte keine Colokalisation der *de novo* amyloiden Proteine mit Mitochondrien nachgewiesen werden. Eine Erklärung könnte sein, dass neu synthetisiertes VDAC auf seinem Weg zu den Mitochondrien von den aggregierenden Proteinen abgefangen wird, so dass es zu einer Verarmung der Mitochondrien an diesen Proteinen kommt. Möglicherweise haben die *de novo* amyloiden Proteine keine Möglichkeit, an topologisch korrekt plaziertem VDAC zu binden, wohl aber an zytosolisch, in instabiler Form vorliegendem.

### 5.1.6 *De novo* amyloide Proteine supprimieren die Proteinbiogenese

Die Mengen der exprimierten *de novo* Proteine im Western Blot (s. z.B. Abb. 4.5 oder 4.7) unterschieden sich deutlich, wobei auch hier die Mengen häufig mit der beobachteten Zytotoxizität korrelierten. Vom  $\alpha$ -helikalen Protein war mengenmäßig mehr vorhanden als von den amyloiden Proteinen, obwohl die Gesamtproteinmengen einen Tag nach Expression nahezu identisch waren. Eine Möglichkeit wäre eine vermehrte Degradation der Proteine, dies wurde jedoch durch Einsatz von proteasomalen Inhibitoren (MG132 und Lactacystin) sowie mittels autophagealem Inhibitor 3-MA mit Ausnahme des bereits diskutierten  $\alpha$ -helikalen Proteins  $\alpha$ n86 widerlegt (s. Abb. 4.25 – 4.27). Auch das Ubiquitinierungsmuster von Proteinen änderte sich im Beisein der amyloiden Proteine nicht (Abb. 4.27), so dass ein Einfluss von UPS und Autophagie auf die Proteinhomöostase in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine unwahrscheinlich ist bzw. die *de novo* Proteine die beiden Systeme auch nicht inhibieren, wie es z.B. bei expandiertem Htt der Fall ist (s. z. B. Abb. 4.102).

---

Es muss sich daher um einen die Proteinbiogenese negativ beeinflussenden Prozess handeln. Da hier in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, ob es sich um Transkription oder (wahrscheinlicher) Translation oder beides handelt, wird hier zusammenfassend von Inhibition der Proteinbiogenese gesprochen. Diese Störung war nicht nur als Autoinhibition bei den produzierten Mengen von amyloiden Proteinen feststellbar, sondern auch bei Cotransfektionen anderer Proteine bzw. bei in Kontrollen erhöhten Mengen exprimierter endogener Proteine.

Aus Abb. 4.29 oder 4.30 wird deutlich, dass die Mengen an coexprimiertem Protein geringer sind, diese mengenmäßige Abstufung geht wiederum einher mit der Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine. Eine absolute Verringerung der Proteinkonzentration war einen Tag nach Transfektion nicht feststellbar (Messung der Proteinkonzentration, Ponceaufärbung, Silbergele (nicht gezeigt) oder GAPDH-Mengen), daher ist wahrscheinlich basierend auf den Daten dieser Arbeit die Neusynthese von Proteinen in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine gestört.

Die massenspektrometrische Untersuchung der Interaktionspartner der *de novo* amyloiden Proteine ergab, dass sehr viele, nämlich 14, Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) mit den *de novo* amyloiden Proteinen interagieren, und viele an der Transkription beteiligten Proteine. Die sehr hohe Anzahl an eIFs, jedoch kaum abundanten ribosomalen Proteinen, spricht dafür, dass ein spezifischer Prozess während der Translationsinitiation gestört wird, möglicherweise durch eine partielle Depletion der Zelle mit diesen Faktoren. Auch hier konnte nicht festgestellt werden, ob und wieviele eIFs mit den *de novo* amyloiden Proteinen direkt interagieren. Es wurde nachgewiesen, dass die eIFs im Komplex agieren (Sonenberg, 2003), so dass entweder die Bindung an einen Faktor alle anderen mit immunpräzipitiert oder gar mehrere der vernetzten Faktoren durch die amyloiden Proteine gebunden werden. Die Interaktion der *de novo* amyloiden Proteine mit den eIFs wurde hier beispielhaft für den Faktor eIF4GII sowohl biochemisch nach Co-IP als auch durch Colokalisation mit den *de novo* amyloiden Aggregaten gezeigt (s. Abb. 4.57 und 4.58). Bei der Co-IP von eIF4GII fällt auf, dass oberhalb der erwarteten Bande von 170 kDa, welche im Beisein amyloider Protein leicht angereichert ist, eine weitere stark angereicherte Bande mit einer apparenten Molmasse von ca. 200 kDa auftritt. Möglicherweise handelt es sich hier um phosphorylierte Spezies, welche besonders stark von den amyloiden Proteinen gebunden werden, bzw. vom Netzwerk anderer Initiationsfaktoren. Die wichtige Rolle der Phosphorylierung von eIF4GII wurde in verschiedenen Untersuchungen belegt (Qin et al., 2003; Coldwell und Morley, 2006).

Es wäre interessant festzustellen, eventuell mit Hilfe der Massenspektrometrie, inwieweit eine Anreicherung phosphorylierter Spezies allgemein zu den beobachteten Phänomenen beiträgt.

Insgesamt ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass durch Inaktivierung oder Depletion der eIFs eine Inhibition oder Verlangsamung der Translation stattfindet, was zur beobachteten Supprimierung der Proteinbiogenese beitragen könnte. Die Beobachtung, dass fehlfaltende Proteine oder exogener Stress zu einer Translationsinhibition führen können, wurde in einigen Fällen nachgewiesen, auch bei der Translationsinitiation (Brostrom und Brostrom, 1998).

### **5.1.7 *De novo* amyloide Proteine interagieren mit labilen Proteinen wie der GFP-Luciferase und können deren Rückfaltung inhibieren**

GFP-Luciferase wurde als Reporterproteinsystem gewählt, da sich einerseits Luciferase als relativ langsam rückfaltendes Protein (Herbst et al., 1997) als Reporter für Störungen bei Faltungsprozessen eignet und Luciferase in mammalischen Zellen nicht natürlicherweise exprimiert wird, andererseits durch das N-terminale GFP das Schicksal des Fusionsproteins *in vivo* verfolgt werden kann. In früheren Studien wurde bereits mit GFP-Luciferase gearbeitet und die Länge des Linkers (16 Aminosäuren) sowie die Anordnung GFP N-terminal – Luciferase C-terminal optimiert (Chang et al., 2005). Bei der Benutzung im eukaryotischen System war es zudem wichtig, die drei letzten Aminosäuren des C-Terminus SKL durch IAV zu substituieren, um damit die PES (peroxisomale Eintrittssequenz) auszuschalten, so dass das Fusionsprotein nicht in Peroxisomen gelenkt wird (Wood, 1998).

Neben der bereits beschriebenen Inhibition der Proteinbiogenese bei Coexpression von GFP-Luciferase mit den *de novo* amyloiden Proteinen, jedoch nicht mit dem *de novo*  $\alpha$ -helikalen Protein (s. Abb. 4.29 und 4.30), wurde festgestellt, dass transient transfizierte GFP-Luciferase und konstitutiv exprimierte GFP-Luciferase, in der während dieser Arbeit generierten stabilen Zelllinie HEK293T—GFP-Luc, mit den Aggregaten der *de novo*  $\beta$ -amyloiden Proteine colokalisierten bzw. selbst partiell in Aggregaten oder aggregat-ähnlichen Strukturen vorlagen. Diese Colokalisierung geschah bereits ohne zusätzlichen exogenen Stress wie z.B. Hitzeschock. Es wurde vermutet, dass die Colokalisation präferentiell mit dem instabileren Luciferase-Anteil des Fusionsproteins stattfand, deshalb wurden in Kontrollexperimenten auch GFP oder EGFP- $\alpha$ -Aktin zusammen mit den *de novo* Proteinen coexprimiert. Hier fand keine Bildung von GFP- oder EGFP- $\alpha$ -Aktin-Aggregaten oder Aggregat-ähnlichen Strukturen statt, so dass der Luciferase-Anteil höchstwahrscheinlich mit den *de novo* amyloiden Proteinen interagiert. Mit dem  $\alpha$ -helikalen Protein  $\alpha$ S824 war keine

---

Aggregatbildung beobachtbar und die Zellen behielten hier auch wieder ihre normale Morphologie.

Mit Hilfe einer Co-IP konnte jedoch keine Interaktion zwischen den *de novo* Proteinen und GFP-Luciferase nachgewiesen werden, die Interaktion der *de novo* amyloiden Proteine mit GFP-Luciferase schien nur sehr schwach oder transient zu sein. Unter den gleichen Bedingungen, unter welchen bei SILAC-Co-IPs Interaktoren der *de novo* Proteine identifiziert werden konnten, wurden hier nach IPs keine Interaktionen des GFP-Luc mit *de novo* Proteinen registriert. Möglicherweise hätten mit Hilfe eines Crosslinking-Experiments Interaktionen mit GFP-Luciferase nach IP der *de novo* Proteine bestätigt werden können, was jedoch während dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurde.

Es wurden mit dem transient transfizierten Reporterprotein Rückfaltungsstudien in Anwesenheit der *de novo* Proteine durchgeführt, und es war ein Trend zu geringerer Rückfaltung der Luciferase bei  $\beta 4$ ,  $\beta 17$  und  $\beta 23$  erkennbar, jedoch waren die Unterschiede nur sehr klein (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat zusammen mit den verringerten Expressionsmengen des Reporterproteins und der Colokalisation führte zu der Entscheidung, eine Zelllinie zu generieren, welche stabil GFP-Luciferase exprimiert.

Ein entscheidender Unterschied zu den transient transfizierten Zellen mit GFP-Luciferase ist die bei der Transfektion und Expression der *de novo* Proteine bereits präexistente GFP-Luciferase. Dies bedeutet, wie in Abb. 4.35 dargestellt, dass keine Inhibition der Proteinbiogenese des Reporterproteins mehr sichtbar wurde und die Proteinmengen der GFP-Luciferase anders als bei den transient transfizierten Zellen zu Beginn der Rückfaltungen identisch waren (Abb. 4.30).

Die GFP-Luciferase-Rückfaltungsergebnisse in der stabilen Zelllinie (s. Abb. 4.37 und 4.38) waren vermutlich aus diesem Grund wesentlich eindeutiger als bei den Versuchen mit transient transfizierter GFP-Luciferase.

Wurde die Rückfaltungsanalyse 24 h nach Transfektion durchgeführt, kristallisierte sich eine stärkere Hemmung der Rückfaltung des GFP-Luc in Anwesenheit des Proteins  $\beta 23$  heraus. Während die Rückfaltung der mit leerem Plasmid transfizierten Kontrolle bei ca. 90 % des Ausgangswertes 60 min. nach HS lag, kehrte die Aktivität der GFP-Luc in der Probe mit Protein  $\beta 23$  nur zu ca. 60 % zurück. Die Aktivitäten der GFP-Luc in Anwesenheit der *de novo* Proteine  $\beta 4$  und  $\beta 17$  kehrten auf ca. 80 % bzw. 75 % der Ausgangsaktivität zurück.

Verschiedene Modelle zur Inhibition der Rückfaltung sind hier vorstellbar. Zum einen könnten die *de novo* amyloiden Proteine direkt mit der GFP-Luciferase interagieren, wie es durch das Auftreten von Coaggregaten ohne Einwirkung von Hitzeschock bereits durch

Mikroskopie nachgewiesen wurde. Auch oder gerade lösliche Spezies der amyloiden Proteine könnten vermehrt mit dem Luciferase-Anteil reagieren und die Rückfaltung behindern, möglicherweise genau die A11-reaktiven Spezies des *de novo* Proteins  $\beta$ 23.

Eine andere Möglichkeit wäre die indirekte Beeinflussung der Rückfaltung der GFP-Luciferase durch die amyloiden *de novo* Proteine. Es wurde bereits nachgewiesen, dass molekulare Chaperone unterschiedlicher Systeme unter verschiedenen Bedingungen die Geschwindigkeit und Menge der Rückfaltung denaturierter Luciferase erhöhen können (Polier et al., 2008; Dragovic et al., 2006; Agashe et al., 2004). In der massenspektrometrischen Analyse der Interaktionspartner wurden verschiedene Chaperone, u.a. Hsc70, Hsp110, NAC $\alpha$  und BAG2 identifiziert. Es wäre also möglich, dass die Chaperone in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine in ihrer Funktion gehemmt, sequestriert oder mit der (unmöglichen) Faltung der *de novo* amyloiden Proteine beschäftigt sind, so dass für die Faltung der GFP-Luciferase keine ausreichende Chaperon-Kapazität vorhanden ist. Dieser Effekt würde dann in besonders hohem Maß für  $\beta$ 23 zutreffen, wo die Rückfaltung sowohl mengen- als auch zeitabhängig inhibiert war.

### 5.1.8 *De novo* amyloide Proteine supprimieren die Hitzeschockantwort (HSR)

Eng mit den vorhergehenden Befunden der inhibierten Proteinbiogenese und der behinderten Rückfaltung des Reporterproteins GFP-Luciferase verbunden stehen Beobachtungen, dass Elemente der HSR nicht in ausreichender Weise durch endogenen und exogenen Stress induziert werden können, wenn *de novo* amyloide Proteine in den Zellen exprimiert wurden.

Als endogener Stress kann hier die Überexpression von amyloiden Proteinen selbst angenommen werden. Es wurde erwartet, dass nach Überexpression dieser für die Zelle deletären Proteine die vermehrte Expression molekularer Chaperone induziert würde, um vor den Effekten dieser fremden, aggregierenden Proteine zu schützen. Dies konnte jedoch für die molekularen Chaperone Hsp27, Hsp70/Hsc70, Hsp90 und Hsp110 nicht nachgewiesen werden. Es könnte also sein, dass die Zelle die artifiziell hergestellten und exprimierten Proteine nicht als Stressoren erkennt und daher auch keine adäquate Stressantwort einleitet. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Systeme, welche die Stressantwort induzieren, durch die Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine behindert oder gar irreversibel geschädigt sind. Exogen verursachter Stress, hier durch Chemikalien oder erhöhte Temperatur hervorgerufen, führte ebenfalls zu keiner Induktion der Expression molekularer Chaperone. Abb. 4.39 zeigt die steigende Expression von Hsp27 nach einem zweistündigem Hitzeschock. Eine Überexpression von Hsp27 war nur für die Kontrolle (leerer Vektor) zu verzeichnen, während

---

in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine die Expression graduell abnahm, im Falle des  $\beta$ 23 war sogar keine vermehrte Expression des Hsp27 zu beobachten.

Auch die vorherige Expression von molekularen Chaperonen, hervorgerufen durch Induktoren wie Celastrol, Withaferin oder MG132 (Westerheide et al., 2004; Mu et al., 2008), ergaben weder eine Erniedrigung der Zytotoxizität in Zellen mit überexprimierten amyloiden Proteinen, noch eine Induktion von hinter einen Hsp70- oder Bip-Promotor geschaltete Luciferase als Reporterprotein. Die Induktion einer Stressantwort unter Hsp70-Promotor-Kontrolle (Williams et al., 1989; Westerheide et al., 2004) wurde erfolgreich durch den proteasomalen Inhibitor MG132 ausgelöst, welcher, wie in Abb. 4.43 die Akkumulation von ubiquitinierten Spezies in den mit MG132 behandelten Zellen belegt, in ausreichend hoher Menge eingesetzt wurde. Die Induktion bei Kontrollzellen betrug dementsprechend mehr als das fünffache der nicht-induzierten Kontrollen, in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine fand überhaupt keine Induktion statt. Vermutlich durch die Toxizität des Inhibitors bedingt (bei 5  $\mu$ M) sanken die Werte sogar noch leicht unter die Ausgangswerte. Wahrscheinlich ist die Verhinderung einer adäquaten Stressantwort ebenfalls auf die verminderte Proteinbiogenese zurückzuführen, wie bereits diskutiert vermutlich auf Translationinhibition beruhend.

Eine andere Alternative wäre eine gezieltere Ausschaltung der Stressantwort durch Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie. HSF-1 ist an der vermehrten Expression vieler molekularer Chaperone als Antwort auf Stressoren beteiligt und kann mit Chromatin-regulierenden Proteinen interagieren (Anckar und Sistonen, 2007); einige wurden ebenfalls als Interaktionspartner in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert (s. Tabelle 8.7 Anhang G). Erst eine Überexpression des in der Massenspektrometrie als Interaktionspartner identifizierten Hsp110 vor Expression der *de novo* amyloiden Proteine, so dass bereits präexistentes Hsp110 zugegegen war, konnte die zytotoxischen Effekte der *de novo* amyloiden Proteine  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 etwas erniedrigen, was unter 5.1.11 genauer diskutiert wird.

Insgesamt trägt sehr wahrscheinlich die Unfähigkeit der Zellen, in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine molekulare Chaperone und andere Elemente der Stressantwort zu induzieren, in starkem Maß zu den zytotoxischen Effekten der fehlgefalteten Proteine bei.

### **5.1.9 *De novo* amyloide Proteine interagieren mit einem essentiellen metastabilen Subproteom und induzieren multifaktorielle Zytotoxizität**

---

Als ein wichtiger Befund der Studie kann der Nachweis von aberranten Interaktionen der *de novo* amyloiden Proteine mit ihren Interaktoren gewertet werden. Diese Interaktionen werden

---

wahrscheinlich durch allgemeine Eigenschaften der Proteinoberflächen während des Aggregationsprozesses der *de novo* amyloiden Proteine vermittelt. Diese Vermutung kann dadurch substanziert werden, dass die *de novo* amyloiden Proteine, die sich in ihrer Sequenz signifikant unterscheiden (s. 4.1.2), mit einem zum Teil deckungsgleichen Subproteom interagieren. Da zwischen den Interaktoren von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 eine große Schnittmenge an Proteinen identifiziert wurde, die bei jedem der *de novo* amyloiden Proteine angereichert worden war, legt dies nahe, dass viele der Interaktionen auf den allen drei *de novo* amyloiden Proteinen gemeinsamen strukturellen Eigenschaften beruhen. Die Interaktoren zeigten keine Präferenz für bestimmte Funktionen in der Zelle; es wurden, insbesondere bei  $\beta$ 23, viele Proteine als Interaktoren identifiziert, welche essenzielle zelluläre Funktionen ausüben und damit für die Aufrechterhaltung der Proteostase notwendig sind (s. Tab. 8.7 Anhang G). Insbesondere sind die Interaktoren mit Funktionen in Translation, Transkription, DNS-Modellierung, Bildung und Aufrechterhaltung des Zytoskeletts, Ausübung mitochondrialer Funktionen und Proteinfaltung stark vertreten.

Es fällt besonders die hohe Anzahl an identifizierten eIFs beim Protein  $\beta$ 23 (insgesamt 14), jedoch auch bei  $\beta$ 17 und  $\beta$ 4 auf. Dieser Befund könnte eine Erklärung dafür liefern, warum die Proteinbiogenese vieler Proteine in Anwesenheit der *de novo* amyloiden Proteine inhibiert ist. Es ist wahrscheinlich, dass die eIFs im Komplex agieren und daher auch als Komplex immunopräzipitiert werden, wie bereits diskutiert (Sonnenberg et al., 2003). Dies schließt jedoch auf Grund der identifizierten Interaktoren nicht aus, dass auch/oder die Transkription beeinträchtigt wird und dies ebenfalls zu einer Inhibition der Proteinbiogenese führt. Ein Test, ob die mRNS-Mengen in Zellen, welche die *de novo* amyloiden Proteine exprimieren, geringer sind, wurde bis jetzt nicht durchgeführt, könnte jedoch darüber Auskunft geben.

Wie bereits unter 5.1.8 diskutiert, hängt die Inhibition der Proteinbiosynthese mit der Unfähigkeit, die HSR in *de novo* amyloide Proteine exprimierenden Zellen zu induzieren, wahrscheinlich eng miteinander zusammen. Neben der möglichen Inaktivierung von eIFs könnte die ausbleibende Stressantwort auch durch Interaktion der *de novo* amyloiden Proteine mit Transkriptionsfaktoren bzw. anderen Proteinen wie SWI/SNF, die ihrerseits mit Transkriptionsfaktoren einschließlich HSF1 interagieren, bedingt sein.

Eine weitere bereits diskutierte Auffälligkeit der Zellen, welche die toxischen Proteine exprimieren, ist ihre veränderte Zellmorphologie und insbesondere die unterschiedliche Anordnung des  $\beta$ -F-Aktinzytoskeletts (s. Abb. 4.24). Unter den Interaktoren von  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 befand sich zwar nicht  $\beta$ -Aktin selbst, es wurden jedoch andere Proteine des Zytoskeletts

nachgewiesen, welche ihrerseits Interaktionen mit  $\beta$ -Aktin eingehen können. So wurden unter den  $\beta 23$ -Interaktoren die Filamine A, B und C identifiziert, welche als Homodimere  $\beta$ -F-Aktin vernetzen und an der Zellmembran verankern können (Popowicz, 2006). Auch das über 500 kDa große Protein Plekton interagiert mit  $\beta$ -Aktin und Intermediärfilamenten und kann daher zusammen mit den Filaminen für den Zusammenbruch des  $\beta$ -F-Aktinzytoskeletts und damit der Zellmorphologie in Folge einer möglichen Interaktion mit den *de novo* amyloiden Proteinen verantwortlich sein (Steinböck und Wiche, 1999).

Bemerkenswerterweise gehen die meisten der  $\beta 23$ -Interaktoren keine oder nur wenige Interaktionen untereinander ein, was nahelegt, dass die Assoziationen mit den  $\beta$ -Aggregaten einige der funktionellen Komplexe zerstören dürften. Es sollten z.B. gemäß der HPRD mehr als 100 verschiedene Interaktoren an dem Mikrofilament Vimentin zu finden sein, es wurden jedoch nur drei dieser Vimentin-Interaktoren unter den identifizierten  $\beta 23$ -Interaktoren als angereichert detektiert, obwohl 37 dieser potentiellen Vimentin-Interaktoren im Hintergrund bzw. der IP des Gesamtzelllysats nachgewiesen wurden. Dagegen wurde die Untereinheit eIF3c im  $\beta 23$ -Interaktom als hoch angereichert detektiert, während eIF3b nicht nachgewiesen werden konnte. Beide eIFs spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Translationsinitiationskomplexes (Zhou et al., 2008), was darauf hindeutet, dass die Assoziation mit den Aggregaten mit der Bildung des funktionellen Komplexes interferiert.

Es wurde festgestellt, dass die Interaktoren von  $\beta 23$  eine höhere Molmasse und mehr IURs aufweisen als der Durchschnitt des hier betrachteten Gesamtproteoms, zudem besteht eine Korrelation zwischen der Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine  $\beta 4$ ,  $\beta 17$  und  $\beta 23$  und deren Interaktoren, wobei die Molmasse zunimmt, die Hydrophobizität abnimmt und der Anteil der Proteine mit IURs zunimmt. Dies könnte zum einen durch eine erhöhte Aggregationsfähigkeit und Ausbildung zytotoxischer Intermediate der *de novo*  $\beta$ -amyloiden Proteine in der Reihenfolge  $\beta 4 < \beta 17 < \beta 23$  erklärbar sein, was zu einer verstärkten Vernetzung führt, wobei insbesondere große und unstrukturierte Proteine in erhöhtem Anteil gebunden werden könnten. Andererseits könnte eine stärkere Hydrophobizität der Proteine bzw. eine vermehrte Freilegung hydrophober Strukturen (Welte, 2007) durch die zytotoxischen *de novo* amyloiden Proteine zu einer verstärkten Interaktion führen, wobei eventuell eine partielle Entfaltung stattfindet, so dass eine Interaktion mit hydrophoben Strukturen weiter forciert wird.

Es wird ferner angenommen, dass Proteine mit den oben beschriebenen Eigenschaften (große Molmasse, reich an IURs) eine hohe strukturelle Flexibilität aufweisen und ihrerseits

an viele Interaktionspartner binden können (Dunker et al., 2008). Darüberhinaus könnten lokale strukturelle Fluktuationen dieser Proteine die Exposition von bestimmten Proteinabschnitten wie hydrophobe Aminosäurereste oder IURs begünstigen, die eine größere Neigung haben zu aggregieren. Die *de novo* amyloiden Proteine könnten ähnlich wie nicht-funktionelle molekulare Chaperone wirken, die zwar bevorzugt hydrophobe Oberflächen von Proteinen und flexible Regionen binden, jedoch die Faltung oder Rückfaltung dieser strukturell labilen Proteine nicht ausführen bzw. die notwendige Liberation der Proteine nicht gestatten. Eine Anhäufung metastabiler Proteine in Aggregate könnte die Folge sein, was wiederum zu einer Oberflächenvergrößerung für aberrante Interaktionen führt, so dass es zu einem lawinenartigen Anstieg deletärer Interaktionen kommt. Werden die mit *de novo* amyloiden Proteinen interagierenden Chaperone wie Hsp110 überexprimiert, so könnten sie diese vor den gegenseitigen, aber auch vor schädlichen Interaktionen mit anderen metastabilen Proteinen der Zelle abschirmen. Konsequenterweise müssten dann jedoch auch andere Interaktionspartner der *de novo* amyloiden Proteine eine solche Abschirmung erreichen können, wenn sie nur in ausreichendem Maß exprimiert worden wären, was experimentell im Rahmen dieser Arbeit noch nicht überprüft wurde.

Auch die bereits diskutierte nur partielle Rückfaltung der GFP-Luciferase in Anwesenheit *de novo* amyloider Proteine und die Colokalisierung unterstützen die Aussage, dass die *de novo* amyloiden Proteine präferentiell mit instabilen Proteinen interagieren. Eventuell sind diese Interaktionen als induzierte Interaktionen ebenfalls sehr instabil und fluktuierend, was das Fehlen der immunpräzipitierten GFP-Luc mit *de novo* amyloiden Proteinen erklären würde.

Die *de novo* amyloiden Proteine interagieren vorwiegend mit langen modularen, strukturell flexiblen Proteinen, die dadurch ihrerseits mit vielen Proteinen interagieren können. Unter diesen sekundären Interaktoren befinden sich viele Proteine mit für die Zelle essentiellen Funktionen, die ihrerseits eine große Anzahl von Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen können, so dass die primären Interaktoren der *de novo* amyloiden Proteine als Knotenpunkte in einem Proteinnetzwerk angesehen können (Goh et al., 2007). Bemerkenswerterweise korreliert die Zahl dieser essentiellen Proteine sowie Proteine, die zuvor im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen identifiziert worden waren (Raychaudhuri et al, 2009) mit der Zytotoxizität der drei *de novo* amyloiden Proteine (s. auch Abb. 4.55). Es ist daher wahrscheinlich, dass die toxischen Formen der *de novo* amyloiden Proteine mit den normalen Interaktoren in der Zelle um die Bindungsstellen in den ungeordneten Regionen erfolgreich kompetieren. Dadurch wird in Abhängigkeit von der

Stärke und Vielzahl der Interaktionen mit den *de novo* amyloiden Proteinen eine steigende Anzahl von zellulären Schlüsselfunktionen beeinträchtigt. Ein Ausfall eines dieser essentiellen Proteine könnte bereits zu einem Zusammenbruch vieler zellulärer Funktionen führen. Sind durch die *de novo* amyloiden Proteine viele essentielle Proteine gebunden und u.U. damit ihrer biologischen Funktion entzogen, kann dies zu den dramatischen Konsequenzen für die Zelle führen. Es wurde bereits diskutiert, dass die Transfektionseffizienz bei Elektroporation in diesem System bei ca. maximal 60 % der Zellen liegt, so dass vor diesem Hintergrund eine Zytoviability von ca. 40 % bedeutet, hauptsächlich die nicht-transfizierten Zellen tragen im Fall des β23 zur gemessenen Zytoviability bei. Dies bedeutet auch, dass in β23 exprimierenden Zellen jegliche Viabilität fehlt, in dieser Stärke vermutlich nur erklärbar durch pleiotrope Effekte auf Zellfunktionen und deren Funktionsträger, die Proteine, welche Schlüsselpositionen im zellulären Geschehen einnehmen.

Möglicherweise stellen multiple Interaktionen und die resultierenden deletären Effekte auf Zellen einen allgemeinen Mechanismus bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen dar. Dies müsste in ähnlichen Experimenten überprüft werden (Co-IP unter SILAC-Bedingungen und anschließender Massenspektrometrie), wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass bei den natürlich vorkommenden Proteinen auch der Verlust ihrer Funktionen zur Pathogenese beitragen kann, was mit dem hier gewählten System der *de novo* Proteine ausgeschlossen werden kann.

### **5.1.10 Verifizierung ausgewählter Interaktoren der *de novo* Proteine mit biochemischen und zellbiologischen Methoden**

Es konnten hier nicht alle Interaktoren einer genaueren Analyse im Hinblick auf ihre möglichen Assoziationen mit den *de novo* amyloiden Proteinen und ihre Auswirkungen auf die Zellen untersucht werden. Beispielhaft wurden einige Interaktoren ausgewählt, welche einerseits hoch angereichert mit den *de novo* amyloiden Proteinen detektiert wurden, andererseits im zellulären Geschehen und in Bezug auf den Zytotoxizitätsmechanismus eine Schlüsselposition einnehmen könnten. Dies sind zum einen die Proteinbiogenese bzw. ihre Inhibierung, die mitochondrialen Proteine und die molekularen Chaperone, deren Kapazität vermutlich auf Grund der Überexpression aggregierender Proteine eingeschränkt ist.

Die mitochondrialen VDAC-Proteine wurden mit den drei *de novo* amyloiden Proteinen hoch angereichert vorgefunden, so dass hier eine spezifische Interaktion vermutet wurde. Es wurde bereits nachgewiesen und diskutiert (s. Abb. 4.23 und Diskussion 5.1.4),

---

dass die *de novo* Proteine nicht mit den Mitochondrien colokalisieren, doch es wäre möglich, dass neusynthetisierte mitochondriale Proteine auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort, z.B. der mitochondrialen Außenmembran, von den *de novo* amyloiden Proteinen erfasst, gebunden und damit ihrer Funktion in den Mitochondrien entzogen werden.

Eine Co-IP mit  $\alpha$ -Myc-Ak ergab bei den Lysaten mit *de novo* amyloiden Proteinen eine klare Präzipitation von VDAC1 im Vergleich zu den Kontrollen der Lysate mit leerem Vektor und  $\alpha$ -helikalem Protein  $\alpha$ S824. Dabei wird VDAC1 mit  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23 stärker immunpräzipitiert als mit  $\beta$ 4; bei anderen Interaktoren sieht dieses Verhältnis anders aus, so sind die Verhältnisse der Anreicherung z.B. bei eIF4GII (s. Abb. 4.57) mit der erwarteten apparenten molaren Masse von 170 kDa bei den drei *de novo* Proteinen in etwa gleich, jedoch wurde stets bei 200 kDa eine zusätzliche angereicherte Bande vorgefunden, welche in der Intensität  $\beta$ 4 <  $\beta$ 17 <  $\beta$ 23 zunimmt. Es wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter analysiert, um welche Spezies es sich bei dieser Bande handelt. Möglicherweise stellt diese Bande die hyperphosphorylierte Form des eIF4GIIs dar, welche in spezifischer Weise mit den drei *de novo* amyloiden Proteinen interagieren kann. Es wurde berichtet, dass die Phosphorylierung von Translationsinitiationsfaktoren die Amyloidogenese begünstigt (O'Connor et al., 2008), andererseits wurde sowohl die Phosphorylierung von eIF4GII gezeigt sowie dessen Einfluss auf eine Inhibition der Mitose (Qin et al., 2003; Pyronnet et al., 2001) nachgewiesen.

Demgegenüber wurde Hsp110, welches als hoch angereichert in der massenspektrometrischen Analyse insbesondere bei  $\beta$ 23 detektiert wurde, in einer graduellen Menge coimmunpräzipitiert, welche wieder dem Muster der Zytotoxizitäten dieser Proteine entspricht, nämlich  $\beta$ 4 <  $\beta$ 17 <  $\beta$ 23 (s. Abb. 4.59). Dies führte zu der Überlegung, dass Hsp110 im Hinblick auf die Faltung und Fehlfaltung dieser Proteine ein wahrscheinlich zentrales molekulares Chaperon darstellt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass die endogene Menge von Hsp110 sich nach Überexpression der *de novo* amyloiden Proteine nicht änderte. Einerseits wäre eine Abnahme denkbar gewesen, da die *de novo* amyloiden Proteine die Proteinbiogenese inhibieren, dies wurde jedoch nicht beobachtet, was für eine hohe Halbwertszeit von Hsp110 in den verwendeten HEK293T-Zellen spricht. Andererseits hätte auch eine Induktion von Hsp110 erwartet werden können, da die *de novo* amyloiden Proteine durch ihre Aggregation einen Stressor darstellen. Eine vermehrte Expression von Hsp110 wurde jedoch nicht beobachtet, entweder, weil die *de novo* Proteine keine Induktion dieses Systems auslösen, oder weil die Induktion wieder durch eine Inhibition der Proteinbiosynthese supprimiert wird. Auch die indirekte Immunfluoreszenz gab einen

weiteren Hinweis, dass die *de novo* amyloiden Proteine und Hsp110 tatsächlich – direkt oder indirekt – miteinander interagieren. Denn es wurde hier (s. Abb. 4.60) eine Colokalisation zwischen Aggregaten *de novo* amyloiden Proteinen und Hsp110 nachgewiesen, so dass Hsp110 offenbar in oder an diese Aggregate verstärkt rekrutiert wird. Ein Teil von Hsp110 war jedoch nach wie vor nicht an die Aggregate der *de novo* amyloiden Proteine assoziiert, sondern im Zytoplasma zu finden. Dabei fällt auf, dass Hsp110 nicht homogen wie z.B. Hsp70/Hsc70 oder das  $\alpha$ -helikale Proteine  $\alpha$ S824 über das Zytoplasma verteilt war, sondern auch in den Kontrollzellen in kleinen granulären Strukturen vorlag. Es gibt verschiedene Deutungsmöglichkeiten dieses Befundes: Es könnte sein, dass Hsp110 an bestimmte Partikel assoziiert, möglicherweise an neusynthetisierte Proteine translatierender Ribosomen. Diese sehr frühe Interaktion mit Proteinen könnte auch ein mögliches Abfangen von neu synthetisierten aggregierenden Proteinen erklären. Eine andere Möglichkeit wäre Stress, welchem die Zellen, auch die Kontrolle, nach der Elektroporation ausgesetzt waren. So wurde berichtet, dass z.B. eine granuläre Verteilung von Hsp110 im Zytoplasma nach Einwirkung von Hitzestress auftrat, dies wurde ebenfalls über indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (Ishihara et al., 1999). Andererseits wurden die Zellen auch nach Lipofektion mit Hsp110 begutachtet, und auch dann traten die granulären Strukturen auf, jedoch nicht im Falle einer hohen Überexpression von Hsp110. Eventuell liegen hier die granulären Strukturen colokalisiert mit anderen zellulären Proteinen vor, so wurde z.B. eine Colokalisation von Hsp110 mit  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen (Saito et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass es sich nicht um ein Artefakt handelt, sondern um eine biologisch relevante Aktion des Hsp110, möglicherweise um im Konzert mit anderen Chaperonen die Faltung neu translatierter Proteine zu ermöglichen. Das gleiche könnte auch für eIF4GII gelten, denn dieses lag in ähnlichen granulären Strukturen, wesentlich kleiner als die Aggregate und auch in Kontrollzellen auftretend, im Zytoplasma der Zellen vor, so dass sich hier möglicherweise ebenso die eIFs um translatierende Ribosomen anordnen. Das Auftreten granulärer Strukturen von eIFs wurde auch ohne die Einwirkung von Stressoren beschrieben, so dass dieses Ergebnis konsistent mit anderen Publikationen ist (Topisirovic et al., 2003; Li und Li, 2006).

### **5.1.11 Überexpression von Hsp110 kann die Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine $\beta$ 4 und $\beta$ 17, sowie partiell die Bildung ihrer Aggregate, vermindern**

Die starke Anreicherung von Hsp110 bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Co-IPs, seine verifizierte Co-IP im gleichen graduellen Muster der Zytotoxizitäten der Proteine

$\beta 4$ ,  $\beta 17$  und  $\beta 23$  sowie seine Colokalisation mit den Aggregaten dieser *de novo* amyloiden Proteine, führten zu der Überlegung, dass eine Überexpression des molekularen Chaperones möglicherweise die Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine modulieren könnte.

Eine synchrone Überexpression von Hsp110 mit den *de novo* Proteinen zusammen erbrachte eine schwache Verminderung der Zytotoxizität von  $\beta 4$  und  $\beta 17$ , jedoch nicht von  $\beta 23$ . Eine Analyse des korrespondierenden Western Blots zeigte, dass Hsp110 in Anwesenheit von  $\beta 4$  nur sehr schwach überexprimiert wurde und mit  $\beta 17$  und  $\beta 23$  keine Erhöhung über das endogene Niveau von Hsp110 stattfand. Wieder war hier wahrscheinlich der Grund eine Inhibition der Proteinbiogenese durch die Expression von *de novo* amyloiden Proteinen.

Daher wurde eine andere Strategie verfolgt. Hsp110 wurde als ein präexistentes Protein überexprimiert, bevor die *de novo* amyloiden Proteine durch Elektroporation in den Zellen überexprimiert wurden. So wurden die Zellen zunächst *via* Lipofektion mit Hsp110 transfiziert, bzw. Kontrollzellen mit einem leeren Vektor, erst einen Tag später die bereits vortransfizierten Zellen mittels Elektroporation mit den *de novo* amyloiden Proteinen transfiziert. Wie Abb. 4.63 verdeutlicht war diese Strategie erfolgreich, denn Hsp110 wurde nun auch in Zellen überexprimiert, in welchen die *de novo* amyloiden Proteine selbst exprimiert wurden. Dies spricht wiederum dafür, dass die *de novo* amyloiden Proteine in die Hemmung der Proteinbiogenese involviert und die verminderten Mengen anderer Proteine nicht auf eine Inhibition degradierender Systeme zurückzuführen sind.

Ein nach drei Tagen an die Elektroporation anschließender MTT-Test ergab eine eindeutige Reduktion der Zytotoxizität bei den mit  $\beta 4$  und  $\beta 17$  transfizierten Zellen, während mit  $\beta 23$  lediglich ein Trend zu verminderter Zytotoxizität erkennbar ist (s. Abb. 4.64). Zu bedenken ist, dass auch hier vermutlich nicht alle Zellen mit Hsp110 und den *de novo* amyloiden Proteinen cotransfiziert sind, so dass vor diesem Hintergrund die Reduktion der Toxizität eine größere Gewichtung erhalten muss. Eine Zelllinie, welche Hsp110 stabil überexprimierte, würde wahrscheinlich noch eindeutigere Ergebnisse von niedrigeren Zytotoxizitäten für  $\beta 4$  und  $\beta 17$  erbringen, jedoch wurde dies im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. Anders als erwartet zeigte Hsp110 im Beisein von  $\beta 23$  nur einen leichten Trend zur verminderten Zytotoxizität. Dies könnte mehrere Ursachen haben, so könnte Hsp110 z.B. fester oder schneller an  $\beta 23$  als an die anderen beiden *de novo* amyloiden Proteine binden, was sich auch in der Co-IP widerspiegelt, und weniger Hsp110 stünde für andere Aufgaben, inklusive eines Nukleotidaustauschs in Hsp70/Hsc70, zur Verfügung

(Dragovic et al., 2006; Raviol et al., 2006; Polier et al., 2008). Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass Hsp110 in unproduktiver Weise an  $\beta$ 23 gebunden wird, ohne die zytotoxischen Berührungsflächen von  $\beta$ 23 in genügender Weise abzuschirmen. Eine dritte Erklärung wäre, dass  $\beta$ 23 mehr als  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 die Konversion normalerweise nativ gefalteter Proteine in partiell entfaltete Proteine induziert, welche zu den vermehrten toxischen Effekten beitragen, die auch eine Überexpression an Hsp110 nicht mehr kompensieren kann. Für diese Erklärung sprechen auch die Befunde der indirekten Immunfluoreszenz des überexprimierten Hsp110 zusammen mit den *de novo* amyloiden Proteinen. Aus Abb. 4.65 geht hervor, dass überexprimierte Hsp110 in der Lage ist, besonders die Proteine  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 in löslicher Form zu halten, weniger  $\beta$ 23. In einigen Fällen bleibt auch die Zellmorphologie der HEK293T-Zellen in ihrer natürlichen Form erhalten, obwohl die *de novo* amyloiden Proteine überexprimiert vorliegen, d.h. spindelförmig und mit Filopodien versehen. Dies spricht ebenfalls dafür, dass Hsp110 direkt an die *de novo* amyloiden Proteine bindet, sie wahrscheinlich, wenn ein gewisses molares Verhältnis der beiden Bindungspartner erreicht ist, in einem löslichen Zustand hält und damit auch deletäre Interaktionen mit anderen Proteinen in der Zelle unterbindet, so dass eine normale Zellmorphologie erhalten bleibt und die Zytotoxizität verringert wird. Es wurde bereits in vorherigen Studien festgestellt, dass Hsp110 in der Lage ist, Aggregation und Zytotoxizität von aggregierenden Proteinen zu supprimieren (Ishihara et al., 2003). Es wurde zudem beschrieben, dass Proteine aus der Hsp110-Familie mehr als die der Hsp70-Familie in der Lage sind, Aggregationen von Proteinen infolge von Hitzeschock zu supprimieren (Yamagishi et al., 2003). Diese Ergebnisse würden sich im Fall der *de novo* amyloiden Proteine bestätigen, denn eine Assoziation von Hsc70 oder Hsp70 in der biochemischen Analyse sowie eine Colokalisation mit den Aggregaten wurde hier nicht nachgewiesen, anders als in der MS-Analyse (Daten nicht gezeigt).

Es wäre interessant festzustellen, inwiefern sich die Zahl der Interaktionspartner der *de novo* amyloiden Proteine nach Überexpression von Hsp110 änderten und inwiefern sich auch deren Zusammensetzung ändern würde. Wenn Hsp110 hier wirklich als Holdase wirken würde, dann würden die Moleküle nur passiv auseinandergehalten. Je mehr Hsp110 in den Zellen vorhanden wäre, um so geringer müsste die Zytotoxizität ausfallen.

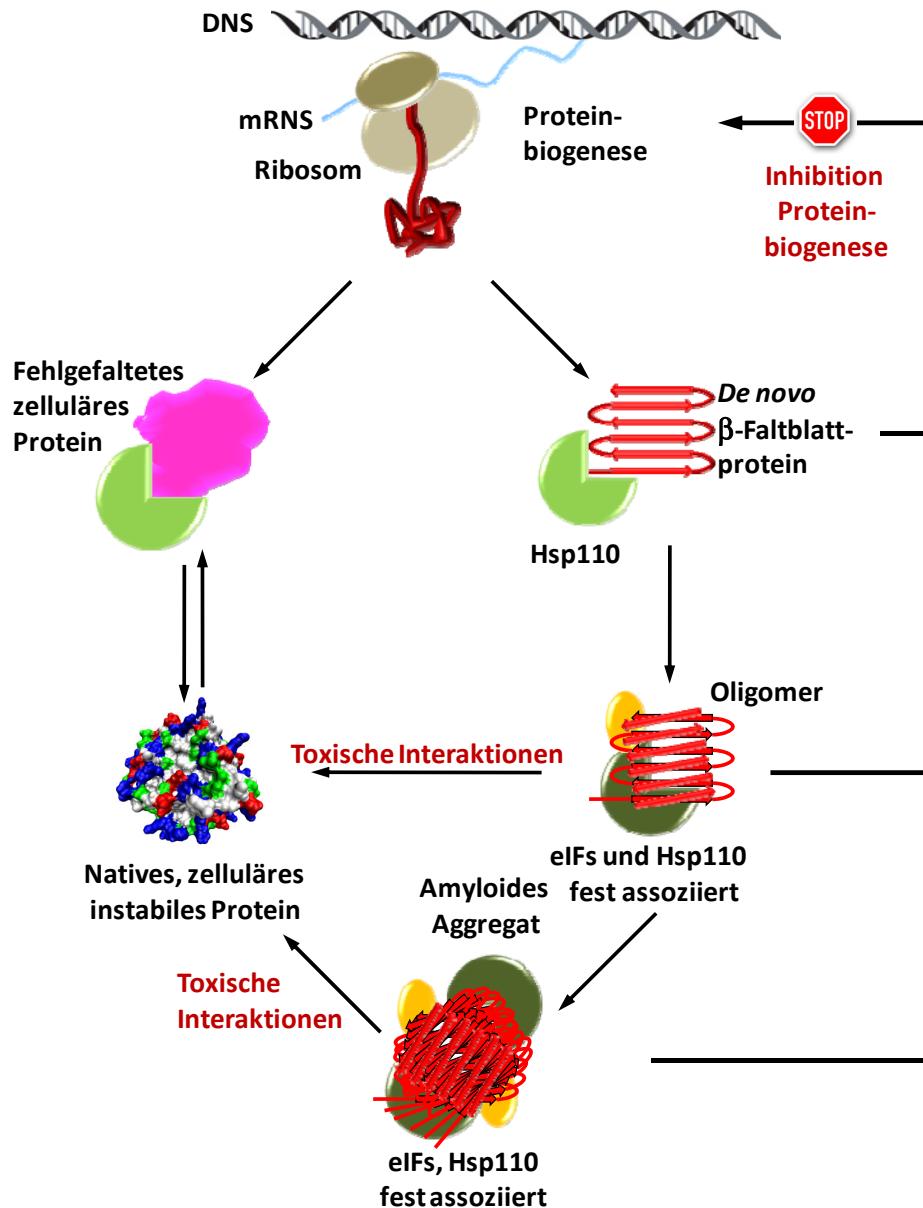
Im Umkehrschluss wurde erwartet, dass eine Verminderung der Hsp110-Expression in den Zellen zu einer verstärkten Zytotoxizität zumindest der *de novo* amyloiden Protein  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 führt, wahrscheinlich nicht von  $\beta$ 23, da hier, wie bereits diskutiert, das Maximum der Zytotoxizität in dem hier verwendeten System aus transiente Transfektion via

Elektroporation und MTT-Test erreicht war. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Zellen vor der Transfektion mit *de novo* Proteinen mit Hsp110-esiRNA behandelt. Die esiRNA-Hsp110 wirkte, wie in Abb. 4.67 und 4.68 dargestellt, sehr effizient, so dass fast kein endogenes Hsp110 mehr detektierbar war im Vergleich zu Kontrollzellen, welche mit esiRNA-GFP behandelt worden waren. Jedoch ergab ein MTT-Test drei Tage nach Transfektion der *de novo* Proteine keine signifikante Änderung in der Zytotoxizität der *de novo* Proteine. Dies könnte entweder darin begründet liegen, dass das Maximum der Zytotoxizität bereits mit kleinen Mengen an nicht an Hsp110-gebundenen *de novo* amyloiden Proteinen ausgeschöpft ist, dass also sogar im Beisein von normalen Mengen an Hsp110 bereits toxische Spezies im Überschuss vorliegen und eine geringere Menge an Hsp110 diesen Überschuss zwar vergrößert, dies jedoch keine Konsequenzen nach sich zieht. Eine andere Möglichkeit wäre eine Kompensation des Ausfalls von Hsp110. Die Zelle könnte über die bereits unter Einleitung 2.4 besprochenen Sensoren einen Mangel an Hsp110 in der Zelle registrieren und versuchen, über kompensatorische Mechanismen diesem Ausfall zu begegnen. Um welche Moleküle und speziell Chaperone es sich handelt, kann hier jedoch nur spekuliert werden, eventuell andere Nukleotidaustauschfaktoren für Hsp70/Hsc70.

Eine weitere Frage stellt sich hier im Zusammenhang mit dem Ergebnis, dass Hsp110 in den biochemischen und zellbiologischen Analysen als bevorzugtes Chaperon identifiziert wurde, jedoch nicht Hsc70 (wie in der MS-Analyse) oder Hsp70. Dies könnte mit dem Umstand zusammenhängen, dass Hsp70, bzw. auch seine Homologen in den beiden anderen Domänen des Lebens, gewisse hydrophobe Muster erkennen, nämlich eine häufig fünf Aminosäuren umspannende hydrophobe Sequenz flankiert von präferentiell basischen Aminosäuren wie K oder R (Rüdiger et al., 1997). Eine durchgehende sequenzielle hydrophobe Region ist bei den *de novo* amyloiden Proteinen in der Primärstruktur jedoch nicht vorhanden, da das alternierende Muster hydrophil-hydrophob des Designs dies ausschließt. Möglicherweise erkennen daher andere molekulare Chaperone wie z.B. Hsp110 solche abnormalen Proteine mit anderen Mustern als kontinuierliche hydrophobe Sequenzen.

### 5.1.12 Modell der durch die *de novo* amyloiden Proteine vermittelte Zytotoxizität

Die vorstehenden Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Diskussion ergeben zusammenfassend ein vorläufiges Modell der zytotoxischen *de novo* amyloiden Proteine. Die Proteine aggregieren und bilden präfibrilläre Intermediate und amyloide Strukturen in den Zellen, wobei das Vorkommen der präfibrillären Intermediate mit der Gradierung ihrer Zytotoxizität korreliert:  $\beta23 > \beta17 > \beta4 >> \alpha S824$ .



**Abb. 5.1: Modell für die Wirkung der zytotoxischen *de novo* amyloiden Proteine.** *De novo* amyloide und zelluläre Proteine werden durch Transkription und Translation, hier zusammenfassend als Proteinbiogenese bezeichnet, gebildet. Die toxischen Spezies, insbesondere die präfibrillären Oligomere, können mit metastabilen zellulären Proteinen in deletärer Weise interagieren, so dass diese **fehlalten**. Sind nicht genug molekulare Chaperone anwesend, weil deren Kapazität z.B. erschöpft ist oder sie von den toxischen Proteinen sequestriert wurden (**Hsp110**), kann die Fehlfaltung in einer Kettenreaktion in der Zelle resultieren. Interaktionen mit essentiellen Proteinen, wie z.B. für viele **eIFs** für die Translation nachgewiesen, kann zur Inhibition der Proteinbiogenese führen.

Dies bedeutet, dass wahrscheinlich die präfibrillären, oligomeren Spezies einen entscheidenden Faktor in der Zytotoxizität darstellen. Die Oligomere könnten daher mehr noch als die großen amyloiden Aggregate mit Proteinen in der Zelle interagieren, vornehmlich mit denjenigen, welche instabil wie Luciferase sind oder ungeordnete Strukturen besitzen, wie andere Proteine, die in der Massenspektrometrie nach SILAC und Co-IP identifiziert wurden. Die Rückfaltung bzw. Faltung dieser Proteine wird behindert, parallel dazu werden essentielle

Faktoren für die Zelle, wie z.B. eIFs, ihrer Funktion entzogen und damit wahrscheinlich auch destabilisiert. Dies könnte zum Zusammenbrechen wichtiger zellulärer Funktionen führen, wie es im Fall der Inhibition der Proteinbiogenese beobachtet wurde. Parallel dazu bzw. in Folge dessen kann die Zelle keine adäquate Stressantwort auf die vermehrte Expression der fehlgefalteten amyloiden Proteine geben, da eine Induktion von molekularen Chaperonen ausbleibt.

Die Folge ist, dass durch die verminderte Chaperonkapazität der Zellen und die aberranten Interaktionen mit den *de novo* amyloiden Proteinen auch andere instabile Proteine ebenfalls fehlalten und nicht wieder in ihre native Form konvertiert werden können.

Hsp110 könnte die toxischen Proteine im Falle von  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 abfangen und andere Proteine vor ihnen abschirmen, doch scheint nicht genügend endogenes Chaperon vorhanden zu sein, um eine Überexpression von fehlfaltenden Proteinen kompensieren zu können.

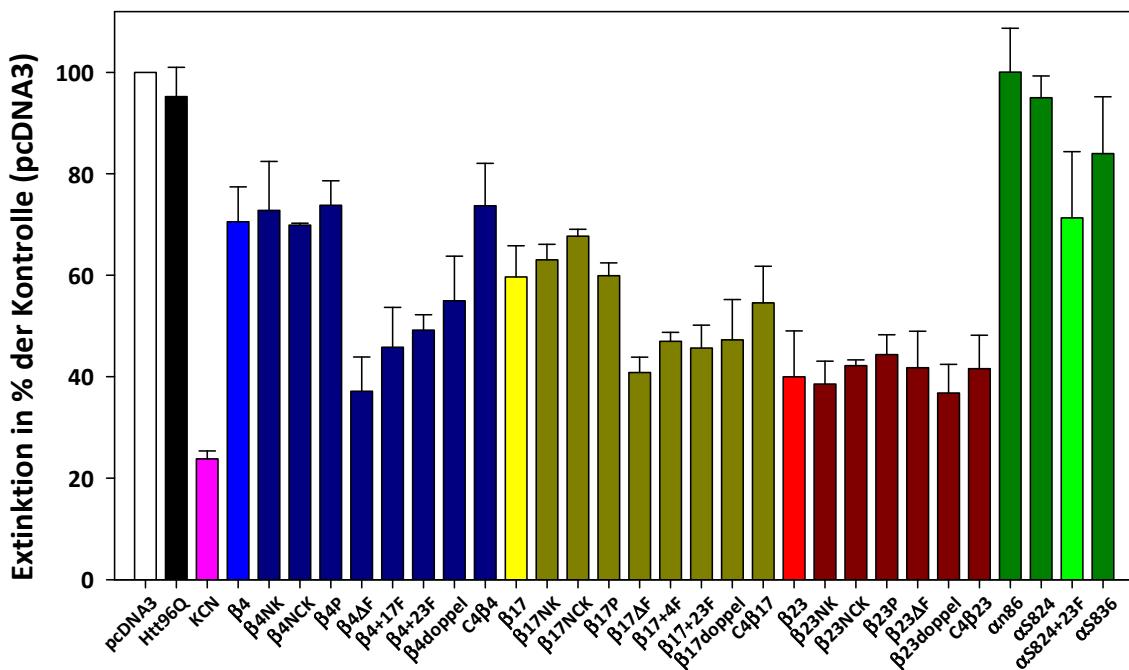
Übertragen auf neurodegenerative Erkrankungen bedeutet dies, dass die entsprechenden Chaperone, welche das jeweils fehlfaltende Protein erkennen (wahrscheinlich unterschiedliche für die verschiedenen fehlfaltenden Proteintypen), ebenfalls überexprimiert werden müssten, um eine genügende Abschirmung und eventuell in Folge dessen Degradation des Moleküls zu bewirken.

### **5.1.13 Konversion der semitoxischen *de novo* amyloiden Proteine durch Extension oder Deletion eines $\beta$ -Stranges in toxische *de novo* amyloide Proteine**

Abb. 5.2 gibt einen Überblick über die Zytotoxizität der modifizierten *de novo* Konstrukte. Aus diesem Überblick wird deutlich, dass einzelne Punktmutationen wenig Änderungen in der Toxizität im Vergleich zu den originalen *de novo* Proteinen bewirken, ebensowenig der Austausch der N-terminalen Tags. Die Verdoppelung der Sequenzen brachte moderate Erhöhungen in der Toxizität für die Konstrukte  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17, die Einführung eines zusätzlichen  $\beta$ -Stranges von sechs auf insgesamt sieben  $\beta$ -Stränge oder die Deletion des letzten von sechs auf fünf  $\beta$ -Stränge, erbrachte für die semitoxischen *de novo* Proteine  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 eine Erhöhung der Toxizität von z.B.  $\beta$ 4 mit 70 % auf  $\beta$ 4+23F mit 49 % Viabilität oder  $\beta$ 17 mit 60 % auf  $\beta$ 17+23F mit 46 % Viabilität. Als Positivkontrolle für Zytotoxizität wurde KCN bei einigen Versuchen eingesetzt, um die respiratorische Kette in Mitochondrien zu unterbrechen.

Von den originalen *de novo* amyloiden Proteinen wurden bereits Mutanten bzw. modifizierte Konstrukte hergestellt, um durch eine Modellierung eine mögliche Änderung ihrer Eigenschaften zu beobachten (Wang und Hecht, 2002). Dabei wurden hydrophobe

Aminosäuren in der Mitte des ersten und letzten  $\beta$ -Stranges der *de novo* amyloiden Proteine durch Lysin substituiert, um damit die hydrophoben intermolekularen Interaktionen zu minimieren und die Proteine löslicher zu halten. Tatsächlich resultierten diese Doppelmutationen mit Lysin in dieser Studie in einer erniedrigten Aggregationstendenz bzw. erhöhten Löslichkeit der *de novo* amyloiden Proteine *in vitro* (s. auch Einleitung 2.6.1).



**Abb. 5.2: Zytotoxizität der originalen und modifizierten *de novo* Proteine.** Die Zytotoxizität wurde wie oben beschrieben mit Hilfe der MTT-Tests erhalten und die einzelnen Konstrukte relativ zur Kontrolle (HEK293T-Zellen transzisiert mit dem leeren Vektor pcDNA3) dargestellt. Als Positivkontrolle für Zytotoxizität dienten Zellen, die einen Tag vor dem MTT-Test mit KCN inkubiert wurden, um die Atmungskette der Mitochondrien zu unterbrechen. Htt96Q dient als weitere Negativkontrolle (siehe auch Abschnitt Ergebnisse 4.3).  $\alpha$ -helikale Proteine sind grün dargestellt,  $\beta_4$  und seine  $\beta_4$ -Modifikationen sind blau dargestellt,  $\beta_17$  gelb und dessen  $\beta_17$ -Derivate dunkelgelb,  $\beta_23$  rot und die  $\beta_23$ -Abkömmlinge dunkelrot.

Diese Änderungen in Löslichkeit bzw. Aggregationsverhalten der entsprechenden Lysinmutanten der Proteine  $\beta_4$ ,  $\beta_17$  und  $\beta_23$  konnten in dem hier verwendeten zellulären *in vivo*-System allerdings nicht nachvollzogen werden (s. Abb. 4.70, 4.71 und 4.72). Die Proteine wurden wie die originalen Proteine  $\beta_4$ ,  $\beta_17$  und  $\beta_23$  im Filter retardiert, zeigten Aggregate oder Aggregat-ähnliche Strukturen in der indirekten Immunfluoreszenz und auch die Zytotoxizität änderte sich nicht signifikant gegenüber den nichtmodifizierten amyloiden Proteinen. Eventuell sind die Aggregate etwas größer und diffuser als bei den originalen *de novo* amyloiden Ausgangsproteinen (s. Abb. 4.72). Möglicherweise verhalten sich die mit Lysin modifizierten *de novo* amyloiden Proteine *in vivo* anders als in den stark verdünnten Lösungen bei den durchgeführten *in vitro*-Versuchen. Eventuell spielt der bereits unter 2.2 der Einleitung beschriebene Effekt des Volumenausschlusses eine Rolle, so dass die Proteine

aufgrund des geringeren Raumes vermehrt dazu gezwungen werden, eine kompaktere Struktur einzunehmen mit kleinerer Oberfläche, was durch Aggregation gegeben sein würde. Auch andere generierte Punktmutationen, wie z.B. die Substitution von zwei Glycinresten durch zwei Prolinreste im mittleren Turn der Proteine, führten zu keiner signifikant veränderten Zytotoxizität gegenüber den *de novo* amyloiden Proteinen (s. Abb. 4.75). Die Prolinmutanten wurden generiert, weil die Hypothese aufgestellt worden war, dass durch eine Unterbrechung des mittleren Turns die Stabilität der *de novo* amyloiden Proteine abnehmen könnte und die Toxizität durch die Freilegung interner hydrophober Reste zunehmen würde. Dies wurde nicht beobachtet, jedoch trat ein anderes Phänomen auf (s. Abb. 4.74). Protein  $\beta$ 4P lief in der SDS-PAGE wie sein Ausgangsprotein  $\beta$ 4 mit gleicher apparenter Molmasse bei ca. 17 kDa, auch die Menge des exprimierten Proteins änderte sich im Vergleich zu  $\beta$ 4 nicht. Dagegen waren die Mengen an exprimiertem  $\beta$ 17P und  $\beta$ 23P signifikant erniedrigt gegenüber den exprimierten Mengen von  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23, außerdem liefen sie bei höherer apparenter Molmasse gegenüber ihren Ausgangsproteinen  $\beta$ 17 und  $\beta$ 23, alle auf gleicher Höhe wie  $\beta$ 4 und  $\beta$ 4P. Ein mögliche Erklärung dieser Phänomene wäre, dass zwar die Instabilität der Proteine zunimmt, dies jedoch keine Auswirkungen auf die Zytotoxizität hat. Möglicherweise wurden die Strukturen leichter durch abbauende Maschinerien degradiert, so dass weniger Protein vorhanden ist, ebenfalls könnte sich die Bindung von SDS an die partiell entfalteten Proteine ändern, so dass auch sie bei höheren apparenten Molmassen aufgetrennt wurden.

Während die Punktmutationen kaum Unterschiede in der Zytotoxizität im Vergleich zu den originalen *de novo* amyloiden Proteinen erbrachten, erhöhte sich die Zytotoxizität der semitoxischen Proteine  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 signifikant, wenn ein zusätzlicher  $\beta$ -Strang, sei es aus diesen beiden Proteinen oder aus  $\beta$ 23, angefügt wurde oder ein  $\beta$ -Strang deletiert wurde (s. Abb. Übersicht 5.2). Von den Extensionen wurde  $\beta$ 4 je um einen  $\beta$ -Strang von  $\beta$ 17 oder  $\beta$ 23 verlängert,  $\beta$ 17 wurde um je einen zusätzlichen  $\beta$ -Strang von entweder  $\beta$ 4 oder  $\beta$ 23 verlängert. Alle verlängerten oder verkürzten Versionen zeigten eine zu den Originalproteinen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 17 erhöhte Zytotoxizität, die um den letzten  $\beta$ -Strang deletierte Version von  $\beta$ 23 änderte die Zytotoxizität nicht.

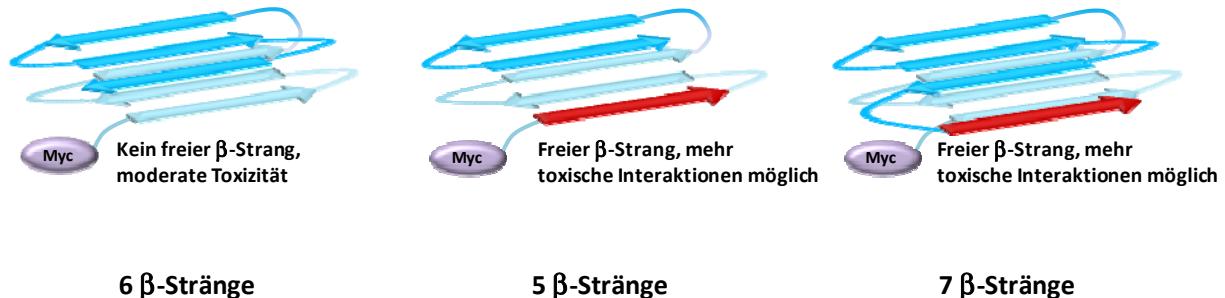
Diese Befunde sprechen für die Hypothese, dass einzelne, freiliegende  $\beta$ -Stränge sehr reaktiv sind, insbesondere was Interaktionen mit anderen  $\beta$ -Strängen anbelangt. Die Natur versucht diese Reaktivität evolutionsbedingt zu vermeiden, indem freie  $\beta$ -Stränge z.B. durch intramolekulare Interaktionen mit anderen Strukturelementen von der Umgebung abgeschirmt

werden bzw. so an intermolekularen Interaktionen mit anderen, komplementären  $\beta$ -Strängen gehindert werden (Richardson und Richardson, 2002). Andere Möglichkeiten, um intermolekulare Interaktionen mit anderen  $\beta$ -Strängen zu vermeiden, sind sie möglichst kurz bzw. mit einem irregulären Muster zu gestalten, was wenig Interaktionsflächen mit komplementären  $\beta$ -Strängen anderer Proteine liefert. Ein einzelner freier  $\beta$ -Strang würde also eine größere, interaktive Oberfläche des Proteins bieten, was die Kontakte mit anderen Proteinen forcieren würde. Insbesondere wenn hydrophobe Reste vor wässriger Lösung abgeschirmt werden müssen, werden zusätzlich zu Interaktionen mit komplementären Aminosäureresten gegenüberliegender  $\beta$ -Stränge auch intermolekulare Interaktionen durch den hydrophoben Effekt begünstigt.

Bei diesen artifiziell generierten *de novo*  $\beta$ -Faltblattproteinen könnte es sein, dass ähnlich wie in Abb. 2.9 der Einleitung dargestellt, die Proteine an den hydrophoben Seitenflächen miteinander interagieren und auf diese Weise aggregieren. Wird ein zusätzlicher  $\beta$ -Strang eingefügt, welcher intramolekular keinen Partner findet (s. Abb. 5.3), so könnte die intermolekulare Interaktion gleicher Moleküle, jedoch auch mit anderen Molekülen, vermehrt stattfinden. Dabei können eventuell die Moleküle wie unter 2.6.1 der Einleitung beschrieben interagieren, im Falle der deletierten Versionen mit 4  $\beta$ -Strängen, die sich intramolekular zusammenfinden, im Falle der extendierten Versionen mit 6  $\beta$ -Strängen, welche sich intramolekular finden. Der zusätzliche  $\beta$ -Strang könnte jedoch wegen seiner Protrusion Interaktionen mit anderen Proteinen in der Zelle eingehen. Daher könnten die Aggregationseigenschaften zwar ähnlich bleiben, die Zytotoxizität jedoch aufgrund vergrößerter Interaktionsflächen und damit vermehrter Kontakte mit anderen Proteinen in der Zelle steigen.

Für diese Hypothese spricht auch das Ergebnis der Zytotoxizität des chimären Proteins  $\alpha$ S824+23F. Hier wurde das  $\alpha$ -helikale Protein  $\alpha$ S824 mit dem letzten Turn und  $\beta$ -Strang des toxischen *de novo* amyloiden Proteins  $\beta$ 23 fusioniert. Abb. 4.88 und 4.89 zeigen, dass Expressionsniveau und Verteilung in der Zelle (homogen, keine Aggregate) dem Ausgangsprotein  $\alpha$ S824 ähneln, jedoch liegt die Zellviabilität (s. Abb. 4.90) mit 75 % in etwa auf dem Niveau von  $\beta$ 4. Möglicherweise kann auch hier dieser wahrscheinlich freiliegende  $\beta$ -Strang vermehrt mit anderen zellulären Proteinen in deletärer Weise interagieren. Es wurde hier nur der letzte  $\beta$ -Strang von  $\beta$ 23 fusioniert, wahrscheinlich gibt es auch Unterschiede in der individuellen Sequenz der  $\beta$ -Stränge untereinander. Anscheinend führt jedoch ein  $\beta$ -Strang allein nicht zur sofortigen Aggregation des chimären Proteins *in vivo*, weil es eventuell

zu kurz ist. Auch die Befunde der verdoppelten Versionen stützen die Hypothese. Eine Verdoppelung der Sequenzen der *de novo* amyloiden Proteine  $\beta 4$  und  $\beta 17$  führten nur zu einem leichten Anstieg ihrer Zytotoxizität, nicht in dem Maße wie deletierte oder extendierte Versionen (s. Abb. 4.87).



**Abb. 5.3: Schematische Darstellung der strukturellen Folgen deletierter oder extendierter Versionen *de novo* amyloider Proteine.** Links ist schematisch ein *de novo*  $\beta$ -Faltblattprotein, z.B.  $\beta 4$  oder  $\beta 17$ , mit einer geraden Anzahl von 6  $\beta$ -Strängen dargestellt. N-terminal beginnend beim Myc-Tag ordnen sich die sechs  $\beta$ -Stränge antiparallel in einer Sandwich-ähnlichen Struktur an, so dass jeder  $\beta$ -Strang durch einen komplementären Partner gesättigt ist. Apikal liegende  $\beta$ -Stränge und Turns wurden hier intensiv blau dargestellt, distal liegende  $\beta$ -Stränge und Turns hellblau. Wird ein  $\beta$ -Strang entfernt (C-terminale, 5  $\beta$ -Stränge) oder ein zusätzlicher  $\beta$ -Strang C-terminal hinzugefügt (7  $\beta$ -Stränge), dann liegt ein  $\beta$ -Strang frei ohne Partner vor (rot), welcher eventuell vermehrte Interaktionen mit zellulären Proteinen eingehen könnte.

Auch hier bildeten die verdoppelten Versionen nach wie vor Aggregate in den Zellen, auch wenn es den Anschein hatte, dass diese etwas kleiner waren als die ihrer originalen Vorläuferproteine, was jedoch nicht systematisch quantifiziert wurde (s. Abb. 4.86). Es wäre möglich, dass diese verdoppelten Versionen eine insgesamt größere Fläche zur Interaktion mit anderen Molekülen der Zelle bieten, obwohl die  $\beta$ -Stränge intramolekular abgesättigt wären.

Die *in vivo* ermittelte Zytotoxizität korrelierte gut mit einer *in silico* bestimmten Zytotoxizität der Mutanten der *de novo* amyloiden Protein (s. Abb. 4.93). Die Analyse korreliert mit den *in vivo*-Daten sowohl für die  $\alpha$ -helikalen Proteine ( $\alpha S836$  toxischer als  $\alpha S824$ ), als auch für die *de novo* amyloiden. Wahrscheinlich konnte das Programm jedoch die Instabilität des  $\alpha n86$  nicht in seine Berechnungen miteinbeziehen, so dass die vermehrte Degradation des  $\alpha n86$  sich bei der *in silico* Analyse nicht in einer verminderten Zytotoxizität äußerte, wie es beim Zellkulturmodell wahrscheinlich der Fall ist. Auch die Toxizitäten der Proteine  $\beta 4$ ,  $\beta 17$  und  $\beta 23$  korrelieren, wobei in der *in silico*-Analyse die Toxizitäten von  $\beta 4$  und  $\beta 17$  sehr eng zusammenliegen. Ebenso korrelierten die um einen  $\beta$ -Strang deletierten Versionen und expandierten Versionen der *in vivo*- und *in silico*-Analyse mit Ausnahme der Mutante  $\beta 4+17F$ . Hier wurde experimentell eine deutlich höhere Zytotoxizität ermittelt, als es der berechneten entsprach. Insgesamt wurde jedoch eine gute Korrelation zwischen der *in vivo* ermittelten Zytotoxizität und der *in silico* berechneten Zytotoxizität erhalten.

## 5.2 Das Aminosäure-Analogon Azc ist zytotoxisch und generiert amyloide Fehlfaltung endogener Proteine

Wie bereits in der Einleitung unter 2.6.2 beschrieben gab es einige Studien, die über das Auftreten von granulären Strukturen oder aggregat-ähnlichen Formen in Folge der Behandlung mit As-Analoga berichteten (Prouty et al., 1975). Auch wurde dargelegt, dass die anomalen Proteine schneller degradiert werden als die nativen Proteine (Prouty et al., 1975; Dean und Riley, 1978). Es wurde zunächst die Toxizität von Azc mit und ohne proteasomale Inhibition bestimmt. Dazu wurden die beiden Komponenten soweit titriert, dass MG132 alleine nur eine minimale Toxizität auslöste, während im Zusammenspiel mit Azc eine Erhöhung der Toxizität auftrat. Mehr als 100 nM MG132 führte zu einer deutlich niedrigeren Zytovialibilität, während weniger Inhibitor das Proteasom nicht mehr ausreichend inhibierte und es auch keinen deutlichen Effekt zusammen mit Azc zeigte. Mengen zwischen 10 nM und 100 nM zeigten hingegen den gewünschten Effekt in HEK293T-Zellen. Bei Azc führten weniger als 1 mM zu keiner deutlichen Erhöhung amyloider Spezies, die noch unter dem Mikroskop nachweisbar wäre; wurden mehr als 3 mM Azc eingesetzt, so resultierte dies in einem deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen, insbesondere in Gegenwart von MG132. Auf Grund dieser Befunde wurden für die Folgeexperimente Konzentrationen von 2 mM Azc und 10 bis 100 nM MG132 gewählt.

Die Zytotoxizität von Azc wurde durch die Inhibition des Proteasoms verstärkt, und zwar dosisabhängig nach MG132-Zugabe. Die Toxizität war zwar ausgeprägt, möglicherweise wäre sie jedoch mit anderen proteasomalen Inhibitoren deutlicher gewesen, und zwar mit Inhibitoren, welche die HSR in geringerem Maße induzieren als MG132 (Bush et al., 1997; Liao et al., 2006; Morimoto, 1998; Westerheide et al., 2004). Wahrscheinlich induziert MG132 auch einen oder mehrere Wege des UPR, welche die Proteostase innerhalb des ER reguliert (Ron und Walter, 2007; Schröder und Kaufman, 2005).

Vor diesem Hintergrund könnte es nämlich sein, dass bestimmte Chaperone im Rahmen der HSR und eventuell auch UPR durch MG132 induziert werden, so dass fehlgefaltete Proteine vermehrt wieder entfaltet und damit dem präfibrillären Weg und den Amyloiden entzogen werden. So würden gewissermaßen die benignen Effekte der Induktion der HSR die malignen Folgen der Inhibition des Proteasoms zu kompensieren versuchen, was anscheinend mit den gewählten Konzentrationen von As-Analogon und proteasomalem Inhibitor nicht gelingt, so dass die toxischen Effekte der Inhibition des Proteasoms überwiegen.

Es wurde bisher noch nicht gezeigt, dass Azc in der Lage ist, durch seine Missinkorporation in zelluläre Proteine amyloide Spezies zu erzeugen. Es wurde zwar, wie erwähnt, von Granula in mit As-Analoga behandelten Zellen berichtet, jedoch wurden keine amyloiden Strukturen oder Spezies in den Zellen nachgewiesen. In Abb. 4.95 wird hier demonstriert, dass NIAD-4 bestimmte Aggregat-ähnliche Strukturen in humanen Zellen anfärbt. NIAD-4 (s. Anhang 8.3 C) ist ein membrangängiges Fluorophor, welches spezifisch an amyloide Strukturen bindet. Daher ist anzunehmen, dass es sich bei den nach Azc-Behandlung, und in höherem Maße zusammen mit MG132 beobachteten Aggregaten, um amyloide Strukturen handelt. Der Effekt war am deutlichsten mit der höheren Dosis von 100 nM MG132 mit 2 mM Azc in Abb. 4.95, jedoch wurden noch deutlichere Effekte mit noch höheren Konzentrationen an Azc und MG132 erhalten (Daten nicht gezeigt), hier war aber die Apoptose so stark und die Nuklei bereits zerfallen oder verkleinert, dass auf so hohe Dosen wie 4 mM Azc und 1 µM MG132 verzichtet wurde.

Das NIAD-4-positive Material lag nicht homogen über die Zelle verteilt vor, sondern akkumulierte bei fast allen behandelten Zellen an einem Ort im Zytoplasma. Die Aggregate oder Aggregat-ähnlichen Strukturen waren bei Konzentrationen von 2 mM Azc und 100 nM MG132 scharf umrissen und besaßen eine runde Form. Sie glichen morphologisch nicht den sehr kleinen Aggregaten der *de novo* Proteine, sondern bildeten häufig große Aggregate. Häufig wurde ein großes Aggregat und mehrere kleine beobachtet, dies gleicht ebenso den Strukturen, die bei diesem Zelltyp mit der expandierten Form des Htt erhalten wurde. Dieser Befund ist insofern erstaunlich, als die Aggregate oder Aggregat-ähnlichen Strukturen vermutlich aus vielen verschiedenen zellulären fehlgefalteten Proteinen bestehen. Es wäre interessant festzustellen, welche Proteine in diese großen Aggregate rekrutiert werden. Wahrscheinlich wird es sich um Proteine handeln, welche einen hohen Anteil an Prolin besitzen, oder bei welchen Prolin Schlüsselfunktionen bei der Faltung einnimmt. Die Zugabe des proteasomalen Inhibitors hat wahrscheinlich zwei Konsequenzen, welche das Auftreten der Aggregate sowie vermehrte Zytotoxizität im Beisein von Azc erklären könnten. Zum einen wird der Abbau der fehlgefalteten Proteine verhindert, so dass diese vermehrt akkumulieren. Zum anderen wird durch proteasomale Inhibition die Degradation anderer Proteine verhindert, so dass nicht genügend Prolin aus deren Abbau zur Verfügung steht und wahrscheinlich durch die Translationsmaschinerie zunehmend Azc in neue Proteine inkorporiert wird (Vabulas und Hartl, 2005).

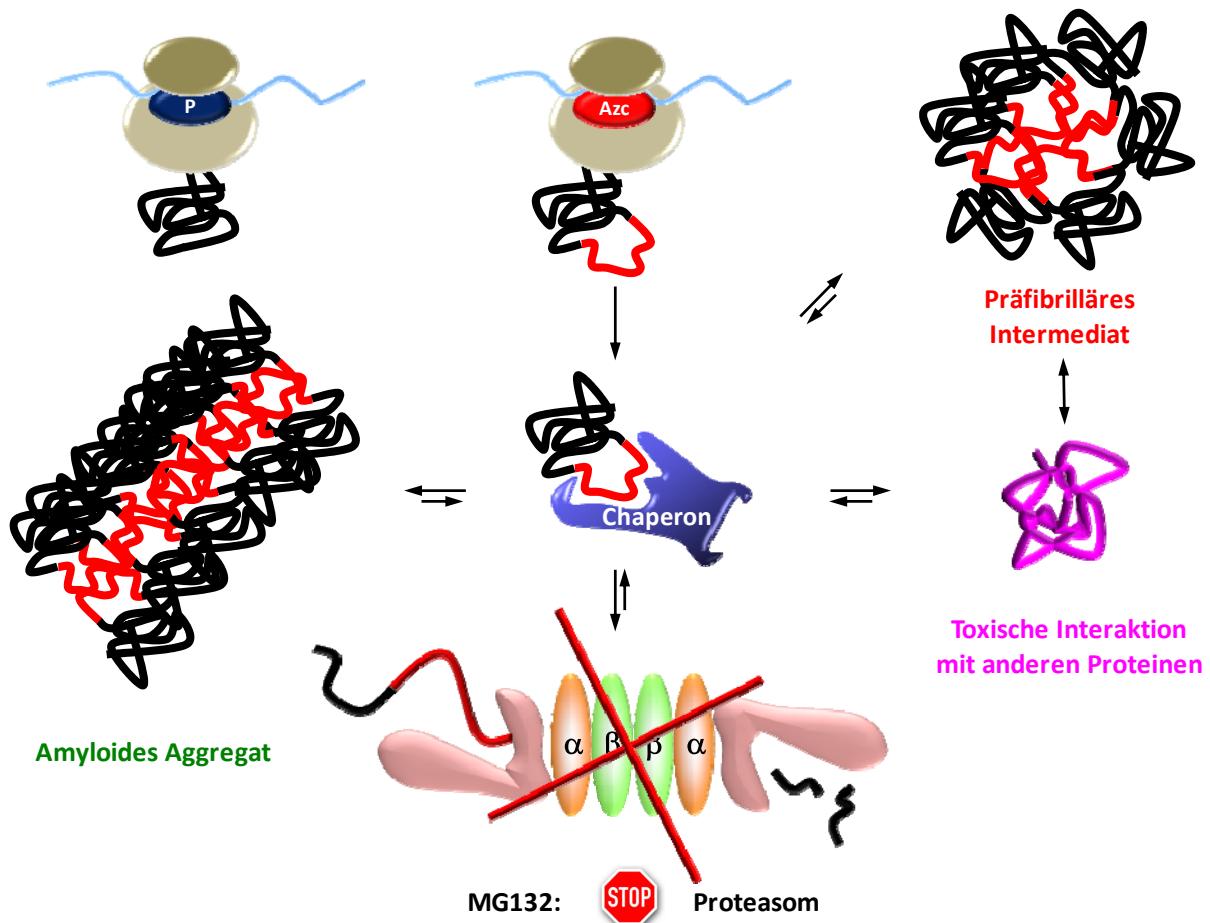
Bei dem beschriebenen perinukleären Ort der Aggregate könnte es sich um ein mammalisches Homolog zu JUNQ in *S. cerevisiae* handeln, welches als juxtanukleär gelegen

---

beschrieben wurde (Kaganovich et al., 2008). Komponenten des ERAD und des UPS könnten hier die Rückfaltung und Degradation von fehlgefalteten Proteinen forcieren, so dass löslichere Aggregate beseitigt werden könnten. Durch Administration des proteasomalen Inhibitors MG132 ist eine Akkumulation der durch Azc fehlgefalteten Proteine auch in einem solchen mammalischen Kompartiment vorstellbar. Ebenfalls interessant wäre eine Bestimmung der Löslichkeit der Aggregate, z.B. in SDS, und wie reversibel diese Akkumulation wäre. Um die Löslichkeit zu bestimmen, könnten Filterretardationstests und Ultrazentrifugation durchgeführt werden, um Reversibilität zu testen, wäre eine Inkubation mit Azc und MG132 denkbar, wobei die Substanzen dann wieder entfernt werden und die Zellen später auf eine mögliche Reduktion der Aggregate hin untersucht werden könnten. Um weiterhin festzustellen, ob der Aggregationsort mit JUNQ verglichen werden kann, wäre eine Colokalisation z.B. mit Proteasomen nützlich, ob hier z.B. auch eine Akkumulation der Proteasomen festgestellt werden kann. Eine Detektion von molekularen Chaperonen könnte darüber Aufschluss geben, ob Komponenten der HSR an der Beseitigung der fehlgefalteten Proteine beteiligt sind.

Einen weiteren Hinweis auf die Erzeugung fehlgefalteter Proteine in den humanen Zellen ergab die Behandlung der nativen Zelllysate mit einem Antikörper, welcher spezifisch präfibrilläre oligomere Strukturen erkennt (Kayed et al., 2006). Ähnlich wie auch bei den *de novo* amyloiden Proteinen konnten diese Strukturen nicht im Dot Blot direkt aus dem nativen Lysat nachgewiesen werden, es trat wieder eine starke Hintergrundreaktion auf (Daten nicht gezeigt). Auch mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie konnte keine Erhöhung des A11-Signals im Vergleich zu den Kontrollzellen (transfiziert mit pcDNA3) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie bei den *de novo* Proteinen wurde jedoch ein spezifisches A11-Signal der mit Azc und MG132 inkubierten Proben nach Auftrennung im Größenausschlussverfahren unter nativen Bedingungen erhalten (s. Abb. 4.96). Offenbar können auch hier störende Hintergrundproteine durch die Gelfiltration herausgefiltert werden, möglicherweise eluieren diese im Ausschlussvolumen oder binden unspezifisch aufgrund aggregierter Strukturen an die Matrix. Wie erwähnt konnte eine Auftrennung bzw. Abtrennung des störenden Hintergrundsignals nicht mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation erreicht werden, möglicherweise wurde die Abtrennung der störenden Proteine durch den Verdünnungseffekt nivelliert. Im Vergleich zu den Signalen der *de novo* amyloiden Proteine traten hier die A11-positiven Signale ebenfalls zwischen 2000 und 232 kDa auf. Dies scheint dafür zu sprechen, dass die präfibrillären oligomeren Spezies, auch wenn sie aus verschiedenen Proteinen gebildet werden, eine ähnliche apparente

Molmasse besitzen und ähnliche Strukturen ausbilden, so dass sie durch den A11-Ak erkannt werden. Möglicherweise werden größere Aggregate auch durch Autophagie, insbesondere Makroautophagie abgebaut (Ravikumar et al., 2002; Sarkar et al., 2007; Ravikumar et al., 2008). Deshalb müssten auch Inhibitoren der Autophagie, z.B. 3-MA, eingesetzt werden, um möglicherweise einen ähnlichen Verstärkungseffekt wie durch proteasomale Inhibitoren zu erzielen. Auch eine Kombination aus proteasomalem und autophagealem Inhibitor zusätzlich zur Azc-Behandlung wäre denkbar, so dass dann eventuell mehr und/oder größere amyloide Aggregate nachgewiesen werden könnten.



**Abb. 5.4: Azc in Kombination mit proteasomalen Inhibitoren führt zur Akkumulation von präfibrillären Oligomeren und amyloiden Aggregaten.**

Prolin (P) kompetiert mit L-Azetidin-2-carbonsäure (Azc) um die entsprechende tRNA und wird konzentrationsabhängig in die wachsende Proteinkette inkorporiert, was zu Fehlfaltungen (rot) des jeweiligen Proteins führt. Werden die Proteine nicht durch das Proteasom degradiert, so kommt es zur Akkumulation von fehlgefaltetem Protein, einhergehend mit der Bildung von präfibrillären Intermediaten (Oligomeren) und fibrillären amyloiden Aggregaten.

Die Analyse der durch den A11-Ak erkannten Spezies wäre ebenfalls interessant, um mögliche Unterschiede zu den Aggregaten festzustellen. Dazu könnten die Fraktionen der Gelfiltration mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden analysiert werden. Ebenso interessant wäre die Analyse der bindenden Proteine, insbesondere ob und wenn ja, welche

---

molekularen Chaperone sich darunter befinden. Dies könnte eventuell auch nach einer Co-IP mit Hilfe des A11-Aks realisiert werden.

Mit Hilfe der in diesem Projekt durchgeführten Experimente wurde nachgewiesen, wie die durch As-Analoga bedingte Fehlfaltung von Proteinen mittels proteasomaler Inhibition intensiviert wird, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Zytotoxizität führt. Auch wurde ein Nachweis erbracht, dass vermehrt präfibrilläre Oligomere und amyloide Spezies nach Inkorporation mit Azc und Inkubation eines proteasomalen Inhibitors gebildet werden, einhergehend mit der Zytotoxizität (s. Modell Abb. 5.4).

### **5.3 Lösliche amyloide Proteine sind zytotoxischer als Aggregate: Htt96Q-CL1 vs. Htt96Q unterstützen diese Hypothese**

Eine einfache Erklärung für die Hypothese (s. Einleitung 2.5.4), dass lösliche, fehlgefaltete Proteine, Oligomere und präfibrilläre Spezies in vielen zellulären Systemen eine höhere Zytotoxizität als Aggregate zeigen, könnte allein physikalisch dadurch begründet werden, dass diese eine größere Oberfläche als Aggregate des gleichen Proteins aufweisen und daher ihre zerstörerische Wirkung besser entfalten können, sei es durch Blockierung des UPS, Abschirmung von Chaperonen oder Interaktion mit anderen essentiellen zellulären Molekülen.

Htt Exon 1 bot sich als Modellprotein an, weil ähnlich prozessierte Formen im menschlichen Gehirn nachgewiesen wurden und angenommen wird, dass die proteolytische Prozessierung des Htt-Proteins ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die Pathogenese bei *C. Huntington* darstellt (Lunkes et al., 2002; Graham et al., 2006). Um expandierte Formen von Htt, z.B. Htt96Q, in löslichere Spezies zu konvertieren, boten sich mehrere Wege an: Interne Mutationen im Exon 1, eventuell sogar in der PolyQ-Sequenz, oder eine Veränderung oder Erweiterung der flankierenden Sequenzen. In einer Studie wurde dargelegt, dass flankierende Sequenzen sowohl die Aggregation als auch die Zytotoxizität des expandierten Htts beeinflussen können (Duennwald et al., 2006).

Wie bereits in der Einleitung dargelegt (2.6.3) wurde das ursprünglich in *S. cerevisiae* nachgewiesene CL1-Degron sowohl im Hefesystem als auch im mammatischen System (Bence et al., 2001) erfolgreich für die Markierung von Proteinen für die proteasomale Degradation eingesetzt.

Eine erste Auffälligkeit des mit CL1 markierten expandierten Htts war dessen aberrante apparente Molmasse. Wahrscheinlich ist eine erhöhte Bindung von SDS an den

hydrophoben Bereich des CL1-Degrons für die niedrigere apparente Molmasse (s. Abb. 4.99) verantwortlich (Rath et al., 2009). Andere Erklärungen könnten sein, dass das CL1-Degron die Entfaltung des kompakten Htt96Qs begünstigt, so dass mehr SDS binden kann und die apparente Molmasse geringer wird, möglich, aber unwahrscheinlicher, wären auch eine vermehrte Prozessierung von Htt96Q-CL1, da wenig Degradationsprodukte auftraten.

Beide Proteine, Htt96Q und Htt96Q-CL1, zeigten über ihrer Hauptbande noch andere sekundäre leiterähnliche Banden. (s. Abb. 4.99 oder 4.101). Es könnte sich dabei zum einen um Multimere der aggregierenden Proteine handeln (Ogawa et al., 2008), andererseits sind auch kovalente Modifizierungen des Proteins, z.B. Ubiquitinierung oder Sumoylierung, denkbar. Für das expandierte Protein Huntingtin wurde gezeigt, dass dieses sowohl ubiquitiniert als auch sumoyliert vorliegen kann (Kalchman et al., 1996; Maynard et al., 2009; Steffan et al., 2004). Dies impliziert bereits, dass Htt und auch seine expandierten Formen, vom UPS erkannt werden und zumindest versucht wird, es zu prozessieren.

Es zeigte sich im mammatischen System (HEK293T-Zellen), dass Htt96Q-CL1 bei in etwa gleichen exprimierten Gesamtmengen in geringerer Menge im Filter retardiert wurde als Htt96Q (s. Abb. 4.100). Wahrscheinlich war ein höherer Anteil von löslichem Htt96Q-CL1 in den Zellen zugegen als bei vergleichbaren Mengen an transfiziertem Htt96Q. Es ist jedoch auch möglich, dass gleiche Mengen an Aggregaten in den Zellen vorlagen, die Aggregate von Htt96Q-CL1 jedoch löslicher in 2 % SDS waren, eine Möglichkeit, die noch untersucht werden müsste. Beide Möglichkeiten bedeuten jedoch, dass die Stabilität der Aggregate bei Htt96Q durch das angefügte CL1-Degron verändert wurde. Die Aggregate von Htt96Q-CL1 akkumulieren dann vermutlich als löslichere Spezies, die eventuell Aggregationsintermediate darstellen könnten. Um dies weiter zu untersuchen, wäre eine Größenauschlusschromatographie von nativen Zelllysaten (Htt96Q vs. Htt96Q-CL1) sinnvoll, um die tatsächlichen Größen der Aggregate und/oder Intermediate besser einschätzen zu können. Auch eine Ultrazentrifugation wäre eventuell nützlich, um das Verhältnis von gelöstem zu aggregiertem Material zu untersuchen.

Die Aggregatgrößen unter dem Mikroskop (s. Abb. 4.109) zeigten, dass sowohl die Aggregate von Htt96Q als auch die von Htt96Q-CL1 scharf umrissen waren, anders als die Aggregate oder zumindest Aggregat-ähnlichen Strukturen des Htt20Q-CL1. Es war unerwartet, dass Htt20Q-CL1 ebenfalls Aggregat-ähnliche Formen ausbilden kann, was klar auf das C-terminal angefügte CL1-Degron zurückzuführen ist, da eine Aggregatbildung bei Htt20Q im verwendeten zellulären System nicht stattfindet. Auf das CL1-Degron zurückzuführende Aggregation wurde jedoch schon in anderem Zusammenhang beschrieben

(Link et al., 2005), dabei wurde das CL1-Degron C-terminal an GFP fusioniert. Sowohl in *C. elegans* als auch im mammalischen Zellsystem wurden in der Publikation Aggregationen des solcherart veränderten GFPs beschrieben, wobei die Aggregate perinuklear detektiert wurden. Dies deckt sich mit den hier erhaltenen Ergebnissen, dass Htt20Q-CL1 ebenfalls Aggregatähnliche Strukturen nahe des Nukleus formt. Die Aggregatbildung des Htt96Q-CL1 wird damit also von zwei Komponenten determiniert: Die Aggregation der PolyQ-Region des Htt96Q-Parts und die Aggregationstendenzen vom CL1-Degron. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch antagonistische Effekte dieser beiden aggregierenden Komponenten in Kraft treten, wenn sie nur in sterisch enger Nähe plaziert sind, so dass die Aggregationsfähigkeit von Htt96Q-CL1 insgesamt abnimmt. Andererseits unterscheiden sich die Aggregate von Htt96Q-CL1 und Htt20Q-CL1 erheblich: Während letztere diffus um den Nukleus herum angeordnet sind und einen viel größeren Raum einnehmen, aggregiert Htt96Q-CL1 in scharf umgrenzten Aggregaten, so dass nur geringe Unterschiede zu den von Htt96Q gebildeten Aggregaten sichtbar sind. Ein Unterschied der Aggregate von Htt96Q-CL1 zu Htt96Q könnte eventuell die Größe sein, so schienen die Aggregate von Htt96Q-CL1 im Schnitt etwas kleiner als die Aggregate von Htt96Q zu sein, jedoch wurde dies nicht quantifiziert. Auch in der Lichtbrechung scheinen sich die Aggregate von Htt96Q und Htt96Q-CL1 nicht zu unterscheiden: Aggregate beider Spezies sind bereits im Hellfeld sichtbar, so dass sich die Dichte dieser Aggregate nicht wesentlich zu unterscheiden scheint. Dagegen bilden die Aggregatähnlichen Strukturen von Htt20Q-CL1 keinen deutlichen Kontrast in den Hellfeld-Aufnahmen. Dieses spricht ebenfalls für die unterschiedliche Natur der Aggregate. Vermutlich würden sich die Aggregate von Htt96Q und Htt96Q-CL1 gut mit für amyloide Strukturen spezifischen Farbstoffen wie z.B. Kongorot oder NIAD-4 (positives Ergebnis für Htt96Q mit NIAD-4, Daten nicht gezeigt) anfärbten lassen, während Htt20Q-CL1 wahrscheinlich nicht positiv reagieren würde, so dass man durch einen solchen Test mehr über die Natur der Aggregate selbst erfahren sollte.

Htt96Q-CL1 bildete nicht nur Aggregate in der Zelle und wurde in geringerem Ausmaß im Filter zurückgehalten als Htt96Q, sondern war deutlich toxischer als Htt96Q (s. Abb. 4.111). Während die Zellviabilität bei Htt96Q fast so hoch wie die der Kontrolle (leerer Vektor) war, lag die Zellviabilität bei Htt96Q-CL1 deutlich niedriger, bei fast 50 % des Kontrollwertes. Htt mit expandierten PolyQ-Sequenzen zeigte sich auch in anderen Studien als wenig toxisch im Vergleich zu Htt mit benignen PolyQ-Längen, im Gegensatz zu an den flankierenden Sequenzen modifiziertem Htt (Krobitsch et al., 2000; Dehay und Bertolotti, 2006). Doch auch Htt20Q-CL1 zeigte eine gewisse Reduktion in der Zellviabilität (auf 83 %),

so dass angenommen werden muss, auch das CL1-Degron selbst ist anteilmäßig für die erhöhte Zytotoxizität verantwortlich.

Wie bereits in der Einleitung unter 2.4 und 2.5.4 angeführt, ist das UPS wahrscheinlich in den Pathomechanismus von *C. Huntington* involviert. Die unter 4.3.3 gezeigten Ergebnisse belegen, dass Htt96Q das UPS inhibieren kann, was in Übereinstimmung zu anderen Studien steht (Bence et al., 2001; Verhoef et al., 2002; Bennet et al., 2005). Ob es sich dabei um eine direkte Inhibition des Proteasoms, oder um eine Inhibition anderer Komponenten des UPS handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert. Eine Akkumulation des Reporterproteins Ub-EGFP bedeutet nur, dass eine Inhibition des UPS stattgefunden hat, eine Inhibition anderer Komponenten als des Proteasoms selbst kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aus Abb. 4.101, 4.102 4.103 und 4.108 geht auch hervor, dass Htt96Q-CL1 das UPS stärker inhibiert als Htt96Q. Da bereits gezeigt wurde, dass das CL1-Degron auch in mammalischen Zellen aktiv ist (Bence et al., 2001; Bence et al., 2005; Kelly et al., 2007) ist es wahrscheinlich, dass ein gezieltes Hinführen von expandiertem Htt zum Proteasom eine stärkere Akkumulation des Reporters auslöst, da das UPS mit dem nicht-prozessierbaren Htt überlastet, seine Kapazität erschöpft ist. Möglicherweise ist tatsächlich eine Blockade des Proteasoms selbst (Venkatraman et al., 2004) für die Akkumulation vom Reporterprotein Ub-EGFP in Anwesenheit von Htt96Q und Htt96Q-CL1 verantwortlich.

Für eine direkte Beteiligung des Proteasoms an der Prozessierung bzw. Blockierung durch Htt96Q-CL1 spricht die Colokalisation von Komponenten des Proteasoms mit Htt96Q-CL1 (s. Abb. 4.109). Es ist hier eine starke Colokalisation zwischen dem Aggregat Htt96Q-CL1 und Rpt1 (proteasomale  $\alpha$ -19S Regulator ATPase-Untereinheit) nachgewiesen worden. Möglicherweise bilden hier Proteasomen oder deren Bestandteile den Nukleationskeim für die Htt96Q-CL1-Aggregate, vielleicht ist die Aggregatbildung der CL1-Konstrukte insgesamt auf eine Nukleation am Proteasom zurückzuführen, wobei expandierte Htt-Fragmente jedoch nicht weiter prozessiert werden können (de Pril et al., 2007). Dazu würde passen, dass auch eine geringere Colokalisation von Htt20Q-CL1 mit der proteasomalen Untereinheit nachweisbar ist. Hier waren wieder Aggregat-ähnliche Strukturen von Htt20Q-CL1 vorhanden, wobei nur für die größten Aggregat-ähnlichen Strukturen eine Colokalisation mit dem Proteasom dargestellt werden konnte. Die proteasomale Untereinheit, und damit vermutlich das Proteasom selbst, waren überwiegend zytoplasmatisch und nur zu geringen Teilen nuklear lokalisiert, übereinstimmend mit Peters et al., 1994. Daher gibt es auch mit Htt20Q eine Colokalisation im Zytoplasma, da dieses auch homogen im Zytoplasma verteilt

vorlag. Bei Htt96Q gab es jedoch einen deutlichen Unterschied zu Htt96Q-CL1: Es fand hier keine Colokalisation der proteasomalen Komponente statt, dafür war eine deutliche Aussparung proteasomaler Komponenten an der Stelle auszumachen, wo die Aggregate plaziert waren. Anscheinend werden Proteasomen nicht in dem Ausmaß wie bei Htt96Q-CL1 zu Aggregaten des Htt96Q rekrutiert (bzw. Htt96Q zum Proteasom), so dass der Bereich des Aggregats von proteasomalen Komponente ausgespart blieb. Dieses Ergebnis war unerwartet, da wie bereits beschrieben, expandierte Formen von Htt96Q ubiquitiniert und sumoyliert vorliegen können, so dass zumindest eine schwache Colokalisation des Proteasoms mit Htt96Q erwartet wurde. Möglicherweise sind die Aggregate von Htt96Q in dem Zellsystem so kompakt, dass nur äußerlich eine Rekrutierung proteasomaler Komponenten an die Aggregate stattfinden kann.

Unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen, wäre auch ein indirekter Effekt des expandierten Htts auf das UPS, z.B. über eine Begrenzung der Chaperon-Kapazität (Gidalevitz et al., 2006) oder der Sequestrierung von für das UPS essentiellen Faktoren, wie es z.B. für Transkriptionsfaktoren gezeigt wurde (Schaffar et al., 2004). Auch das UPS selbst und seine Blockierung könnten die Zytotoxizität zusätzlich unterstützen, indem andere Faktoren, z.B. apoptotische, aktiviert werden (Jana et al., 2001).

Es wurde mit verschiedenen Methoden versucht den Einfluss von Htt96Q bzw. seiner modifizierten Version Htt96Q-CL1 auf das UPS zu demonstrieren. Einerseits wurde die Akkumulation des Reporterproteins Ub-EGFP im Zelllysat mit anschließendem Western Blot nachgewiesen, ein Nachweis der Akkumulation gelang jedoch auch mit einer generierten stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP *via* FACS-Analyse (Abb. 4.107). Eine Akkumulation des Reporterproteins konnte auch mit mikroskopischer Hilfe in Zellen nachgewiesen werden, die Htt96Q und Ub-EGFP coexprimieren (Abb. 4.103). Die FACS-Analyse wies jedoch auch nach, dass Htt20Q-CL1 zu einer stärkeren Inhibition des UPS führt als Htt20Q.

Die Generierung der stabilen Zelllinie HEK293T—Ub-EGFP stellte eine wichtige Verbesserung für die FACS-Experimente im Vergleich zu der transienten Transfektion dar. Mit der transienten Transfektion konnte keine Akkumulation des Reporterproteins Ub-EGFP im FACS gemessen werden, zumindest nicht in einer signifikanten Zellzahl. In der stabilen Zelllinie war – wenn auch schwach im Vergleich zu Inhibition des Proteasoms mit MG132 – eine Akkumulation von Ub-EGFP in Zellen transfiziert mit Htt96Q messbar, mehr Zellen sprachen auf Htt96Q-CL1 an. Dies zeigt, dass die Akkumulation des Ub-EGFP bei Htt96Q-CL1 bei den verwendeten HEK293T-Zellen sowohl biochemisch als auch zellbiologisch nachweisbar ist.

Aus Abb. 4.102 geht hervor, dass die Akkumulation des Reporterproteins Ub-EGFP zeitabhängig erfolgt. Sechs Stunden nach Transfektion ist zwar sowohl mit Htt96Q als auch mit Htt96Q-CL1 eine Inhibition des UPS festzustellen, jedoch gibt es keine Unterschiede zwischen den Mengen an akkumuliertem Reporter. Nach 24 h war ein deutlicher Unterschied zwischen Htt96 und Htt96Q-CL1 zu verzeichnen, wobei im Beisein von Htt96Q-CL1 eine vermehrte Akkumulation des Ub-EGFP stattfand im Vergleich zu Htt96Q. Ein interessantes Ergebnis, was aus Abb. 4.102 hervorgeht, ist jedoch auch, dass die exprimierten Mengen an Htt96Q und Htt96Q-CL1 6 h nach Transfektion höher sind als nach 24 h, anders als die Level an GAPDH. Dies spricht dafür, dass Htt96Q und Htt96Q-CL1 durch einen kompensatorischen, alternativen Mechanismus degradiert werden können. So ein kompensatorischer Mechanismus könnte die Autophagie sein; wie in vielen Studien gezeigt wurde, wird expandiertes Htt, und besonders seine Aggregate, durch Autophagie, vornehmlich durch Makroautophagie, degradiert (Ravikumar et al., 2002; Sarkar et al., 2007; Ravikumar et al., 2005). Inhibition der Zellen mit 3-MA, einem Inhibitor für Autophagie (Abb. 4.104), führte zu einer Akkumulation von Htt96Q in den hier verwendeten HEK293T-Zellen, in Übereinstimmung mit anderen Publikationen (z. B. Ravikumar et al., 2002). Der Einfluss der Autophagie auf die Degradation von Htt96Q-CL1 wurde hier nicht untersucht, jedoch könnte der Prozess der Autophagie die Verminderung der Proteinlevel von Htt96Q und Htt96Q-CL1 24 h nach Transfektion erklären.

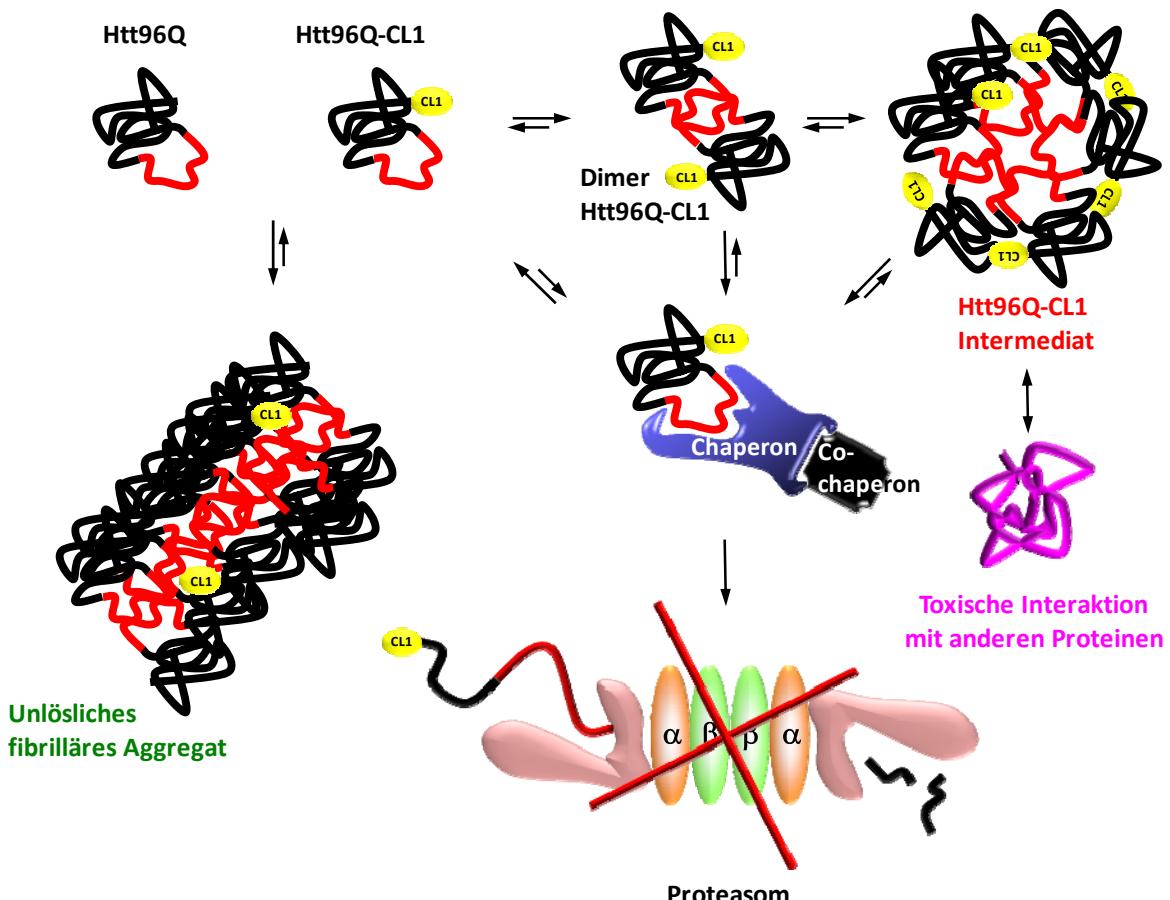
Nach Cotransfektion von Htt-Konstrukten und dem Reporterprotein Luciferase hinter dem Bip-Promotor (Iwata und Koizumi, 2005) oder Hsp70-Promotor (Westerheide et al., 2004) (s. Abb. 4.110) wurde deutlich, dass Bip durch die CL1-markierten Htt-Konstrukte induziert werden konnte, was bei dem Hsp70-Promotor nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt). Die Induktion mit den Konstrukten Htt20Q-CL1 und Htt96Q-CL1 erreichte ca. das 1,5-fache der Negativkontrolle und lag auf dem gleichen Niveau der Positiv-Kontrolle, bei welcher die UPR mit DTT induziert wurde. Die Induktion von Bip war daher im Vergleich zur Positiv-Kontrolle unerwartet hoch. Anscheinend haben CL1-markierte Proteine großen Einfluss auf das Chaperon Bip, welches im ER lokalisiert und an der UPR beteiligt ist. Übereinstimmend dazu wurde im Hefesystem gezeigt (nachdem die Versuche hier durchgeführt wurden), dass die ER-Membran und ihre assoziierten Enzyme notwendig sind, um CL1-markierte Proteine zu degradieren (Metzger et al., 2008). Möglicherweise bietet das ER in mammalischen Zellen eine ähnliche Plattform und die Expression von Bip wird indirekt über die Bindung von CL1-markierten Proteinen induziert, eine Erhöhung der Proteinmenge vom endogenen Bip selbst wurde jedoch nicht getestet. Luciferase unter

Hsp70-Promotor-Kontrolle wurde nicht erhöht vorgefunden, eine prinzipielle Induktion dieses Systems ist jedoch auch in HEK293T-Zellen, die bereits eine hohe endogen exprimierte Hsp70-Menge aufweisen, möglich (s. 4.1 Ergebnisse *de novo* Proteine).

Htt96Q-CL1 bildet, bezogen auf die hier durchgeführten Filterretardationstests, weniger aggregierendes, SDS-resistentes Material, inhibiert das UPS stärker als die unmarkierte Form Htt96Q und zeigt eine wesentlich höhere Zytotoxizität. Wege, die Zytotoxizität zu eliminieren, könnten zum einen die Neutralisierung der toxischen Spezies durch andere Proteine, eine Suppression der Expression oder eine erhöhte Degradationsrate sein. Da die Degradation selbst wahrscheinlich in den Zytotoxizitätsmechanismus involviert ist, wurde versucht die Neutralisierung der toxischen Spezies mit anderen Proteinen zu erreichen. Dazu wurde das in mammalischen Zellen nicht zytotoxische Htt96Q zusammen mit Htt96Q-CL1 transfiziert. Htt96Q-CL1 musste dabei in großen DNS-Mengen transfiziert werden, um genügend Zellen mittels Elektroporation zu transfizieren, so dass die Zytotoxizität klar messbar wurde (30 µg DNS pro Transfektion). Die Cotransfektion von < 30 µg Htt96Q (s. 4.112) brachte keine Verbesserung der Zytotoxizität. Erst als die DNS des Htt96Q hoch konzentriert und in Verhältnissen von Htt96Q-CL1 : Htt96Q von 1:3 eingesetzt wurde, ergab sich eine Reduktion der Zytotoxizität, die bei einem Verhältnis von 1:4 jedoch wieder anstieg. Dieser Effekt war mit Htt20Q und Htt96Q-CL1 nicht zu beobachten, hier blieb die Zytotoxizität auch bei Überschuss an Htt20Q konstant hoch (s. Abb. 4.113).

Es könnte tatsächlich sein, dass Htt96Q-CL1 und dessen toxische Spezies durch einen Überschuss an Htt96Q neutralisiert wird. Eine verminderte Expression von Htt96Q-CL1 infolge der vermehrten Coexpression mit Htt96Q oder Htt20Q kann ausgeschlossen werden, die löslichen Anteile von Htt96Q-CL1 waren im Western Blot bei Coexpression nicht verringert (s. Abb. 4.116 und 4.118). Verschiedene Möglichkeiten kommen für diesen Effekt in Betracht: (1) Eine direkte Interaktion zwischen Htt96Q-CL1 und Htt96Q, wobei Htt96Q-CL1 und dessen toxische Spezies möglicherweise durch Inkorporation in Htt96Q-Aggregate neutralisiert würde; (2) ein indirekter Effekt von Htt96Q auf Htt96Q-CL1 z.B. durch Induktion bestimmter Chaperone, so dass auch so eine indirekte Neutralisierung stattfindet oder (3) ein vermehrter Umsatz der toxischen Spezies, welcher sich nicht in der Gesamtproteinmenge niederschlägt. Viel spricht für Möglichkeit (1), die direkte Interaktion von Htt96Q und Htt96Q-CL1, z.B. weil Aggregate von coexprimiertem Htt96Q und Htt96Q-CL1 exakt colokalisieren (s. Abb. 4.114). Es wurde weiterhin mit einem Filterretardationstest gezeigt, dass Htt96Q-CL1 im Beisein von Htt96Q stärker in Aggregaten zurückgehalten wird als wenn es allein exprimiert wurde (Abb. 4.115 und 4.117), wobei dieser Effekt mit Htt20Q

ehler invers war. Diese Befunde sprechen ebenfalls für die erste Alternative, nach welcher Htt96Q-CL1 direkt mit Htt96Q interagiert, in Aggregate rekrutiert werden kann und so etwas von seiner Toxizität einbüßt. Es wurde in anderem Zusammenhang gezeigt, dass Interaktionen zwischen verschiedenen PolyQ-Proteinen stattfinden und deren biologische Funktion beeinträchtigen können, bzw. es zur Sequestration kommt (Perez et al., 1998; McCampbell et al., 2000; Schaffar et al., 2004).



**Abb. 5.5: Modell zur Wirkungsweise des zytotoxischen Htt96Q-CL1 und dessen Neutralisierung durch Htt96Q.** Htt96Q-CL1 ist löslicher als Htt96Q und zeigt eine erhöhte Zytotoxizität, vermutlich sind Intermediate für diese Zytotoxizität verantwortlich. Diese können **toxische Interaktionen** mit anderen zellulären Proteinen eingehen und daher ihre Funktionen beeinträchtigen. Die CL1-markierten toxischen Spezies werden zum Proteasom gelenkt, führen jedoch direkt oder indirekt zur Inhibition des UPS. Eng damit verbunden wäre die Erschöpfung der Chaperon-Kapazität, so dass die Inhibition des UPS bereits auf dieser Stufe stattfinden könnte. Rekrutierung von toxischen Htt96Q-CL1-Spezies in unlösliche Aggregate von z.B. Htt96Q vermindert die Löslichkeit und Toxizität von Htt96Q-CL1.

Zusammenfassend deuten die Befunde von Htt96Q-CL1 in HEK293T-Zellen darauf hin, dass eine Konvertierung der expandierten Form des Htt in eine löslichere, zytotoxischere Form durch die C-terminale Fusion mit dem CL1-Degron stattfindet. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass löslichere Intermediate im höheren Maße für die Zytotoxizität verantwortlich sind als fibrilläre Aggregate. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen

löslicheren Spezies um Intermediate, Oligomere, welche im Filter nicht retardiert werden. Eine stärkere Inhibition des UPS korreliert mit der Löslichkeit des Htt96Q-CL1 und dessen höherer Toxizität im Vergleich zum nichtmodifizierten Htt96Q. Die Zytotoxizität röhrt daher wahrscheinlich zu einem Teil von einer Inhibition des UPS und seiner auch für andere essentielle zelluläre Proteine erschöpften Degradationskapazität her. Diese Ergebnisse stimmen mit Teilen anderer Arbeiten überein, in welchen demonstriert wurde, dass im mammalischen System expandierte PolyQ-Spezies das UPS zu inhibieren vermögen, was zur Toxizität beiträgt (Bence et al., 2001; Verhoef et al., 2002; Bennet et al., 2005). Natürlich schließt diese Erklärung andere Hypothesen zur Zytotoxizität nicht aus, so könnten z.B. auch die Chaperon-Kapazität der Zelle erschöpft sein (Gidalevitz et al., 2006) oder andere Proteine durch Interaktionen mit den toxischen Spezies nicht mehr für zelluläre Aufgaben zur Verfügung stehen bzw. sequestriert werden (z.B. Schaffar et al., 2004).

Vermutlich handelt es sich auch bei diesem speziellen Fall der aberrant faltenden Proteine, des PolyQ-expandierten Htts bei *C. Huntington*, um einen multifaktoriellen Ablauf der Pathogenese auf zellulärem Niveau, so dass die Inhibition mehrere zellulärer Systeme (UPS, Chaperon-System) für den Zelltod der Neuronen verantwortlich sind.

## 5.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verschiedenen untersuchten aggregierenden, amyloiden Proteine

Abschließend stellt sich die Frage, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei den verschiedenen Modellen beobachtet wurden und welche Schlüsse allgemein im Hinblick auf aggregierende, amyloide Proteine daraus gezogen werden können.

Die hier untersuchten *de novo* amyloiden Proteine, Htt oder durch Azc induzierte fehlfaltende Proteine haben gemeinsam, dass sie aggregieren, amyloid bzw. amyloid-ähnlich sind und präfibrilläre Strukturen bilden. Die Zytotoxizität von expandiertem Htt mit CL1-Tag geht mit seiner Löslichkeit einher, eine wahrscheinliche Rekrutierung in unlöslichere Aggregate hebt diese Zytotoxizität nahezu auf. Die Toxizität der *de novo* amyloiden Proteine korreliert mit der Bildung präfibrillärer Spezies, ebenso im Falle der induzierten Zytotoxizität durch Azc und MG132. Zusammengenommen bedeutet dies, dass kompakte Strukturen wahrscheinlich die Zytotoxizität verringern, während kleine, lösliche Strukturen, mit großem Verhältnis Oberfläche zu Volumen mit möglicherweise hoher Mobilität, Flexibilität und Hydrophobizität, die Zytotoxizität erhöhen. Eine Rekrutierung in Aggregate mit kleinem

Verhältnis von Oberfläche zu Volumen stellt für die Zelle, ungeachtet des individuellen aggregierenden Proteins, wahrscheinlich eine protektive Maßnahme dar.

Die Aggregatgröße der amyloiden Proteine variierte beträchtlich. Während sowohl bei Htt als auch bei durch Azc und MG132 induzierte Aggregation die Aggregate groß, kompakt und rund, mit scharfer Begrenzung waren, fanden sich im Falle der *de novo* amyloiden Proteine unregelmäßig geformte und angeordnete kleinere Aggregate. Möglicherweise korreliert dies mit ihrer hohen Zytotoxizität allgemein, ungeachtet der Gradierung. Bei der durch Azc induzierten Aggregation handelt es sich um zelleigene, nicht überexprimierte Proteine. Deshalb ist es um so erstaunlicher, dass diese distinkte, scharf begrenzte Aggregate bilden. Möglicherweise handelt es sich bei einigen um besonders instabile, für Fehlfaltung anfällige Proteine, mit möglichen Überschneidungen zum Interaktom der *de novo* amyloiden Proteine. Vor diesem Hintergrund wäre es sehr interessant, das durch Azc induzierte „Aggregom“ genauer zu analysieren. Für die Analyse könnten die Aggregate isoliert und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden untersucht werden, wobei gleichzeitig potentielle Interaktionspartner mit erfasst werden würden.

Die höhere Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine mit einer ungeraden Anzahl an  $\beta$ -Strängen könnte allgemein den Schluss zulassen, dass intramolekular nicht gepaarte  $\beta$ -Stränge zu deletären Prozessen in Zellen und höherer Zytotoxizität führen. Es wäre denkbar, spezielle Inhibitoren oder inerte Proteine mit komplementären Strukturen zu entwickeln, um diese reaktiven Spezies abzufangen. Offenbar können sich Proteine mit ungerader Anzahl an  $\beta$ -Faltblättern nicht selbst inaktivieren, d.h. durch Dimerbildung absättigen.

Es wurde nicht überprüft, ob z.B. eine Überexpression von Hsp110 auch die Zytotoxizität der *de novo* amyloiden Proteine mit einer ungeraden Anzahl an  $\beta$ -Strängen verringern könnte. Wäre dies der Fall, könnte mit einer Überexpression bestimmter Chaperone im Allgemeinen versucht werden, Proteine mit reaktiven  $\beta$ -Faltblättern zu inaktivieren. Dabei sollten Chaperone oder Cochaperone wie Hsp110 nicht außer acht gelassen werden. Sie sind eventuell evolutionär nicht an bestimmte Proteine mit definierten Faltungs- oder Fehlfaltungsmustern angepasst, jedoch können sie möglicherweise auf Proteine mit Mutationen, wie es bei neurodegenerativen Erkrankungen oder bei den hier verwendeten *de novo* Proteinen der Fall ist, mit höherer Plastizität reagieren.

## 6. Literatur

- Agashe, V.R., Guha, S., Chang, H.C., Genevaux, P., Hayer-Hartl, M., Stemp, M., Georgopoulos, C., Hartl, F.U., and Barral, J.M. (2004). Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed. *Cell* 117, 1 99-209.
- Amaral, M.D. (2004). CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci* 23, 41-48.
- Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Barnes, G., Bates, G.P., Lin, C.S., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., Altherr, M., *et al.* (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 20, 27-38.
- Anckar, J., and Sistonen, L. (2007). Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv Exp Med Biol* 594, 78-88.
- Andersson, T., and Hagel, L. (1984). Some properties and applications of Superose 6B. *Anal Biochem* 141, 461-465
- Andrade, M.A., and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11, 115-116.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A., *et al.* (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 398-403.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- Anfinsen, C.B., and Haber, E. (1961). Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* 236, 1361-1363.
- Anfinsen, C.B., Redfield, R.R., Choate, W.L., Page, J., and Carroll, W.R. (1954). Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem* 207, 201-210.
- Apell, H.J., Nelson, M.T., Marcus, M.M., and Lauger, P. (1986). Effects of the ATP, ADP and inorganic phosphate on the transport rate of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump. *Biochim Biophys Acta* 857, 105-115.
- Arber, W., and Linn, S. (1969). DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 38, 467-500.
- Arispe, N., Rojas, E., and Pollard, H.B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 567-571.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431, 805-810.
- Auluck, P.K., and Bonini, N.M. (2002). Pharmacological prevention of Parkinson disease in Drosophila. *Nat Med* 8, 1185-1186.
- Azzi, A., Chance, B., Radda, G.K., and Lee, C.P. (1969). A fluorescence probe of energy-dependent structure changes in fragmented membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62, 612-619.
- Baeza, J.L., Gerona-Navarro, G., Perez de Vega, M.J., Garcia-Lopez, M.T., Gonzalez-Muniz, R., and Martin-Martinez, M. (2008). Azetidine-derived amino acids versus proline derivatives. alternative trends in reverse turn induction. *J Org Chem* 73, 1704-1715.

- Beckmann, R.P., Mizzen, L.E., and Welch, W.J. (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854.
- Behrends, C., Langer, C.A., Boteva, R., Bottcher, U.M., Stemp, M.J., Schaffar, G., Rao, B.V., Giese, A., Kretzschmar, H., Siegers, K., *et al.* (2006). Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. *Mol Cell* 23, 887-897.
- Bell, E.A. (2003). Nonprotein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture. *J Agric Food Chem* 51, 2854-2865.
- Bence, N.F., Bennett, E.J., and Kopito, R.R. (2005). Application and analysis of the GFPu family of ubiquitin-proteasome system reporters. *Methods Enzymol* 399, 481-490.
- Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science* 292, 1552-1555.
- Bennett, E.J., Bence, N.F., Jayakumar, R., and Kopito, R.R. (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17, 351-365.
- Berridge, M.V., and Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482.
- Bhatia, R., Lin, H., and Lal, R. (2000). Fresh and globular amyloid beta protein (1-42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J* 14, 1233-1243.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bowman, A.B., Yoo, S.Y., Dantuma, N.P., and Zoghbi, H.Y. (2005). Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet* 14, 679-691.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradley, M.O., Hayflick, L., and Schimke, R.T. (1976). Protein degradation in human fibroblasts (WI-38). Effects of aging, viral transformation, and amino acid analogs. *J Biol Chem* 251, 3521-3529.
- Brockwell, D.J., and Radford, S.E. (2007). Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol* 17, 30-37.
- Broome, B.M., and Hecht, M.H. (2000). Nature disfavors sequences of alternating polar and non-polar amino acids: implications for amyloidogenesis. *J Mol Biol* 296, 961-968.
- Brostrom, C.O., and Brostrom, M.A. (1998). Regulation of translational initiation during cellular responses to stress. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58, 79-125.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416, 507-511.
- Burke, J.R., Enghild, J.J., Martin, M.E., Jou, Y.S., Myers, R.M., Roses, A.D., Vance, J.M., and Strittmatter, W.J. (1996). Huntington and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 2, 347-350.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.

- Caughey, B., and Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**, 267-298.
- Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Bonini, N.M., and Paulson, H.L. (1999). Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci* **19**, 10338-10347.
- Chai, Y., Shao, J., Miller, V.M., Williams, A., and Paulson, H.L. (2002). Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9310-9315.
- Chang, H.C., Kaiser, C.M., Hartl, F.U., and Barral, J.M. (2005). De novo folding of GFP fusion proteins: high efficiency in eukaryotes but not in bacteria. *J Mol Biol* **353**, 397-409.
- Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L., and Horwich, A.L. (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**, 620-625.
- Chien, P., DePace, A.H., Collins, S.R., and Weissman, J.S. (2003). Generation of prion transmission barriers by mutational control of amyloid conformations. *Nature* **424**, 948-951.
- Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-366.
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., and Dobson, C.M. (2003). Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* **424**, 805-808.
- Ciehanover, A., Hod, Y., and Hershko, A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 1100-1105.
- Clelland, C.D., Barker, R.A., and Watts, C. (2008). Cell therapy in Huntington disease. *Neurosurg Focus* **24**, E9.
- Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R.M., Kelly, J.W., and Dillin, A. (2006). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* **313**, 1604-1610.
- Cohen, F.E., and Kelly, J.W. (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* **426**, 905-909.
- Coldwell, M.J., and Morley, S.J. (2006). Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. *Mol Cell Biol* **26**, 8448-8460.
- Cornett, J., Cao, F., Wang, C.E., Ross, C.A., Bates, G.P., Li, S.H., and Li, X.J. (2005). Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat Genet* **37**, 198-204.
- Cowie, D.B., Cohen, G.N., Bolton, E.T., and De Robichon-Szulmajster, H. (1959). Amino acid analog incorporation into bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta* **34**, 39-46.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367-1372.
- Craufurd, D., Thompson, J.C., and Snowden, J.S. (2001). Behavioral changes in Huntington Disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* **14**, 219-226.
- Cuellar, J., Martin-Benito, J., Scheres, S.H., Sousa, R., Moro, F., Lopez-Vinas, E., Gomez-Puertas, P., Muga, A., Carrascosa, J.L., and Valpuesta, J.M. (2008). The structure of CCT-Hsc70 NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 858-864.

- Cuervo, A.M., Bergamini, E., Brunk, U.T., Droke, W., Ffrench, M., and Terman, A. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy 1*, 131-140.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science 305*, 1292-1295.
- Cummings, C.J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A., Orr, H.T., Beaudet, A.L., and Zoghbi, H.Y. (1999). Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron 24*, 879-892.
- Dagert, M., and Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene 6*, 23-28.
- Darnell, G., Orgel, J.P., Pahl, R., and Meredith, S.C. (2007). Flanking polyproline sequences inhibit beta-sheet structure in polyglutamine segments by inducing PPII-like helix structure. *J Mol Biol 374*, 688-704.
- Darzynkiewicz, Z. (1990). Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Methods Cell Biol 33*, 285-298.
- Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science 302*, 819-822.
- de Pril, R., Fischer, D.F., Roos, R.A., and van Leeuwen, F.W. (2007). Ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K increases aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases. *Mol Cell Neurosci 34*, 10-19.
- Dean, R.T., and Riley, P.A. (1978). The degradation of normal and analogue-containing proteins in MRC-5 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta 539*, 230-237.
- Dehay, B., and Bertolotti, A. (2006). Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J Biol Chem 281*, 35608-35615.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A., et al. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron 14*, 1075-1081.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science 277*, 1990-1993.
- Dill, K.A., and Chan, H.S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol 4*, 10-19.
- Dinner, A.R., Sali, A., Smith, L.J., Dobson, C.M., and Karplus, M. (2000). Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci 25*, 331-339.
- Dobson, C.M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356*, 133-145.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature 426*, 884-890.
- Dobson, C.M., and Ellis, R.J. (1998). Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *EMBO J 17*, 5251-5254.
- Dohmen, R.J., Wu, P., and Varshavsky, A. (1994). Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science 263*, 1273-1276.
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics 21*, 3433-3434.
- Dou, F., Netzer, W.J., Tanemura, K., Li, F., Hartl, F.U., Takashima, A., Gouras, G.K., Greengard, P., and Xu, H. (2003). Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A 100*, 721-726.

- Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26, 300-306.
- Dragovic, Z., Broadley, S.A., Shomura, Y., Bracher, A., and Hartl, F.U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J* 25, 2519-2528.
- Duennwald, M.L., Jagadish, S., Muchowski, P.J., and Lindquist, S. (2006). Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11045-11050.
- Dunker, A.K., Silman, I., Uversky, V.N., and Sussman, J.L. (2008). Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol* 18, 756-764.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407-410.
- Eisenberg, D. (1984). Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem* 53, 595-623.
- Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378-379.
- Ellis, R.J. (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* 26, 597-604.
- Etchells, S.A., and Hartl, F.U. (2004). The dynamic tunnel. *Nat Struct Mol Biol* 11, 391-392.
- Etlinger, J.D., and Goldberg, A.L. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 54-58.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Folstein, S.E., Leigh, R.J., Parhad, I.M., and Folstein, M.F. (1986). The diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* 36, 1279-1283.
- Fowden, L., and Bryant, M. (1959). Nitrogenous compounds and nitrogen metabolism in the Liliaceae. 5. The metabolism of azetidine-2-carboxylic acid. *Biochem J* 71, 210-217.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2002). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.
- Gatchel, J.R., and Zoghbi, H.Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6, 743-755.
- Gidalevitz, T., Ben-Zvi, A., Ho, K.H., Brignull, H.R., and Morimoto, R.I. (2006). Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* 311, 1471-1474.
- Gilon, T., Chomsky, O., and Kulka, R.G. (1998). Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 17, 2759-2766.
- Gilon, T., Chomsky, O., and Kulka, R.G. (2000). Degradation Signals Recognized by the Ubc6p-Ubc7p Ubiquitin-Conjugating Enzyme Pair. *Mol Cell Biol* 20, 7214-7219.
- Glover, J.R., and Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73-82.
- Go, A., Kim, S., Baum, J., and Hecht, M.H. (2008). Structure and dynamics of de novo proteins from a designed superfamily of 4-helix bundles. *Protein Sci* 17, 821- 832.
- Goeckeler, J.L., Stephens, A., Lee, P., Caplan, A.J., and Brodsky, J.L. (2002). Overexpression of yeast Hsp110 homolog Sse1p suppresses ydj1-151 thermosensitivity and restores Hsp90-dependent activity. *Mol Biol Cell* 13, 2760-2770.

- Goh, K.I., Cusick, M.E., Valle, D., Childs, B., Vidal, M., and Barabasi, A.L. (2007). The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8685-8690.
- Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H. (1989). Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* 342, 884-889.
- Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T., and Johnston, S.A. (2002). Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* 296, 548-550.
- Grabe, M., and Oster, G. (2001). Regulation of organelle acidity. *J Gen Physiol* 117, 329-344.
- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., et al. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179-1191.
- Griffin, B.A., Adams, S.R., Jones, J., and Tsien, R.Y. (2000). Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FlAsH. *Methods Enzymol* 327, 565-578.
- Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., et al. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234-238.
- Gutekunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., and Hersch, S.M. (1995). Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8710-8714.
- Gutekunst, C.A., Li, S.H., Yi, H., Mulroy, J.S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R.J., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19, 2522-2534.
- Haacke, A., Broadley, S.A., Boteva, R., Tzvetkov, N., Hartl, F.U., and Breuer, P. (2006). Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet* 15, 555-568.
- Haacke, A., Hartl, F.U., and Breuer, P. (2007). Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem* 282, 18851-18856.
- Hammarstrom, P., Wiseman, R.L., Powers, E.T., and Kelly, J.W. (2003). Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science* 299, 713-716.
- Hardy, J. (2004). Toward Alzheimer therapies based on genetic knowledge. *Annu Rev Med* 55, 15-25.
- Harper, J.D., Wong, S.S., Lieber, C.M., and Lansbury, P.T. (1997). Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* 4, 119-125.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16, 574-581.
- Hartman, M.C., Josephson, K., Lin, C.W., and Szostak, J.W. (2007). An expanded set of amino acid analogs for the ribosomal translation of unnatural peptides. *PLoS One* 2, 972.
- Harvey, C.L., Gabriel, T.F., Wilt, E.M., and Richardson, C.C. (1971). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. IX. Synthesis and properties of the deoxyribonucleic acid adenylate in the phage T4 ligase reaction. *J Biol Chem* 246, 4523-4530.

- Haynes, C., Oldfield, C.J., Ji, F., Klitgord, N., Cusick, M.E., Radivojac, P., Uversky, V.N., Vidal, M., and Iakoucheva, L.M. (2006). Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes. *PLoS Comput Biol* 2, e100.
- Hazeki, N., Tukamoto, T., Goto, J., and Kanazawa, I. (2000). Formic acid dissolves aggregates of an N-terminal huntingtin fragment containing an expanded polyglutamine tract: applying to quantification of protein components of the aggregates. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 386-393.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., and Ellis, R.J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334.
- Herbst, R., Schafer, U., and Seckler, R. (1997). Equilibrium intermediates in the reversible unfolding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase. *J Biol Chem* 272, 7099-7105.
- Hickey, M.A., and Chesselet, M.F. (2003). Apoptosis in Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 255-265.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., and Anderson, K.C. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61, 3071-3076.
- Hinault, M.P., Ben-Zvi, A., and Goloubinoff, P. (2006). Chaperones and proteases: cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging. *J Mol Neurosci* 30, 249-265.
- Hoogeveen, A.T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K.E., Roos, R.A., van Ommen, G.J., and Galjaard, H. (1993). Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 2, 2069-2073.
- Hooke, R. (1665). *Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses*. London: J Martyn and J Allestry *first edition*.
- Hundley, H.A., Walter, W., Bairstow, S., and Craig, E.A. (2005). Human Mpp11 J protein: ribosome-tethered molecular chaperones are ubiquitous. *Science* 308, 1032-1034.
- Huntington, G. (1872). On Chorea. *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia* 26 317-321.
- Hutchison 3rd, C.A., Phillips, S., Edgell, M. H., Gillam, S., Jahnke, P., Smith, M. (1978). Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* 253, 6551-6560.
- Hyun, D.H., Lee, M., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Halliwell, B., and Jenner, P. (2002). Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem* 277, 28572-28577.
- Iakoucheva, L.M., Brown, C.J., Lawson, J.D., Obradovic, Z., and Dunker, A.K. (2002). Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol* 323, 573-584.
- Ignatova, Z., and Giersch, L.M. (2004). Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 523-528.
- Ishihara, K., Yamagishi, N., and Hatayama, T. (2003a). Protein kinase CK2 phosphorylates Hsp105 alpha at Ser509 and modulates its function. *Biochem J* 371, 917-925.
- Ishihara, K., Yamagishi, N., Saito, Y., Adachi, H., Kobayashi, Y., Sobue, G., Ohtsuka, K., and Hatayama, T. (2003b). Hsp105alpha suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. *J Biol Chem* 278, 25143-25150.
- Ishihara, K., Yasuda, K., and Hatayama, T. (1999). Molecular cloning, expression and localization of human 105 kDa heat shock protein, hsp105. *Biochim Biophys Acta* 1444, 138-142.

- Iwata, A., Christianson, J.C., Bucci, M., Ellerby, L.M., Nukina, N., Forno, L.S., and Kopito, R.R. (2005). Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13135-13140.
- Iwata, A., Nagashima, Y., Matsumoto, L., Suzuki, T., Yamanaka, T., Date, H., Deoka, K., Nukina, N., and Tsuji, S. (2009). Intranuclear degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* **284**, 9796-9803.
- Iwata, Y., and Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5280-5285.
- Jahn, T.R., and Radford, S.E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J* **272**, 5962-5970.
- Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K., and Nukina, N. (2005). Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* **280**, 11635-11640.
- Jana, N.R., Tanaka, M., Wang, G., and Nukina, N. (2000). Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet* **9**, 2009-2018.
- Jana, N.R., Zemskov, E.A., Wang, G., and Nukina, N. (2001). Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* **10**, 1049-1059.
- Jeong, H., Mason, S.P., Barabasi, A.L., and Oltvai, Z.N. (2001). Lethality and centrality in protein networks. *Nature* **411**, 41-42.
- Jimenez, J.L., Guijarro, J.I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C.M., Sunde, M., and Saibil, H.R. (1999). Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J* **18**, 815-821.
- Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-1898.
- Kaarniranta, K., Oksala, N., Karjalainen, H.M., Suuronen, T., Sistonen, L., Helminen, H.J., Salminen, A., and Lammi, M.J. (2002). Neuronal cells show regulatory differences in the hsp70 gene response. *Brain Res Mol Brain Res* **101**, 136-140.
- Kagan, B.L., Hirakura, Y., Azimov, R., and Azimova, R. (2001). The channel hypothesis of Huntington's disease. *Brain Res Bull* **56**, 281-284.
- Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**, 1088-1095.
- Kaiser, C.M., Chang, H.C., Agashe, V.R., Lakshmi, S.K., Etchells, S.A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., and Barral, J.M. (2006). Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes. *Nature* **444**, 455-460.
- Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M., and Hayden, M.R. (1996). Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* **271**, 19385-19394.
- Kalchman, M.A., Koide, H.B., McCutcheon, K., Graham, R.K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F.C., Wellington, C., Metzler, M., et al. (1997). HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* **16**, 44-53.
- Kamtekar, S., Schiffer, J.M., Xiong, H., Babik, J.M., and Hecht, M.H. (1993). Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* **262**, 1680-1685.

- Karzon, D.T., and Bussell, R.H. (1959). Cytopathic effect of canine distemper virus in tissue culture. *Science 130*, 1708-1709.
- Kayed, R., and Glabe, C.G. (2006). Conformation-dependent anti-amyloid oligomer antibodies. *Methods Enzymol 413*, 326-344.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science 300*, 486-489.
- Kegel, K.B., Sapp, E., Yoder, J., Cuiffo, B., Sabin, L., Kim, Y.J., Qin, Z.H., Hayden, M.R., Aronin, N., Scott, D.L., et al. (2005). Huntington associates with acidic phospholipids at the plasma membrane. *J Biol Chem 280*, 36464-36473.
- Keller, J.N., Gee, J., and Ding, Q. (2002). The proteasome in brain aging. *Ageing Res Rev 1*, 279-293.
- Kelly, S.M., Vanslyke, J.K., and Musil, L.S. (2007). Regulation of ubiquitin-proteasome system mediated degradation by cytosolic stress. *Mol Biol Cell 18*, 4279-4291.
- Kerner, M.J., Naylor, D.J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.C., Stines, A.P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M., Mann, M., et al. (2005). Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli. *Cell 122*, 209-220.
- Keshava Prasad, T.S., Goel, R., Kandasamy, K., Keerthikumar, S., Kumar, S., Mathivanan, S., Telikicherla, D., Raju, R., Shafreen, B., Venugopal, A., et al. (2009). Human Protein Reference Database--2009 update. *Nucleic Acids Res 37*, D767-772.
- Kim, S., Nollen, E.A., Kitagawa, K., Bindokas, V.P., and Morimoto, R.I. (2002). Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol 4*, 826-831.
- Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C.G., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R.I., and Nagata, K. (2006). Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat Cell Biol 8*, 1163-1170.
- Kittler, R., Heninger, A.K., Franke, K., Habermann, B., and Buchholz, F. (2005). Production of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for gene silencing in mammalian cells. *Nat Methods 2*, 779-784.
- Kittler, R., Surendranath, V., Heninger, A.K., Slabicki, M., Theis, M., Putz, G., Franke, K., Caldarelli, A., Grabner, H., Kozak, K., et al. (2007). Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat Methods 4*, 337-344.
- Kleber, H.P., Schlee, D., Schöpp, W. (1997). Biochemisches Praktikum. Methoden für Studium, Praxis, Forschung, Biochemische Tafeln im Anhang.
- Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2004). Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem 279*, 25497-25502.
- Klyubin, I., Walsh, D.M., Lemere, C.A., Cullen, W.K., Shankar, G.M., Betts, V., Spooner, E.T., Jiang, L., Anwyl, R., Selkoe, D.J., et al. (2005). Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med 11*, 556-561.
- Knowles, S.E., and Ballard, F.J. (1978). Effects of amino acid analogues on protein synthesis and degradation in isolated cells. *Br J Nutr 40*, 275-287.
- Kourie, J.I. (2001). Mechanisms of amyloid beta protein-induced modification in ion transport systems: implications for neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol 21*, 173-213.
- Kourie, J.I., Farrelly, P.V., and Henry, C.L. (2001). Channel activity of deamidated isoforms of prion protein fragment 106-126 in planar lipid bilayers. *J Neurosci Res 66*, 214-220.
- Kourie, J.I., and Shorthouse, A.A. (2000). Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol 278*, C1063-1087.

- Kremer, J.J., Pallitto, M.M., Sklansky, D.J., and Murphy, R.M. (2000). Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry* 39, 10309-10318.
- Krobitsch, S., and Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1589-1594.
- Kumar, P., Ambasta, R.K., Veereshwarayya, V., Rosen, K.M., Kosik, K.S., Band, H., Mestril, R., Patterson, C., and Querfurth, H.W. (2007). CHIP and HSPs interact with beta-APP in a proteasome-dependent manner and influence Abeta metabolism. *Hum Mol Genet* 16, 848-864.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakshminipathy, S.K., Tomic, S., Kaiser, C.M., Chang, H.C., Genevaux, P., Georgopoulos, C., Barral, J.M., Johnson, A.E., Hartl, F.U., and Etchells, S.A. (2007). Identification of nascent chain interaction sites on trigger factor. *J Biol Chem* 282, 12186-12193.
- Lane, J.M., Parkes, L.J., and Prockop, D.J. (1971). Effect of the proline analogue azetidine-2-carboxylic acid on collagen synthesis in vivo. II. Morphological and physical properties of collagen containing the analogue. *Biochim Biophys Acta* 236, 528- 541.
- Lang, K., and Schmid, F.X. (1988). Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding. *Nature* 331, 453-455.
- Lansbury, P.T., Jr. (1999). Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3342-3344.
- Lashuel, H.A., Hartley, D., Petre, B.M., Walz, T., and Lansbury, P.T., Jr. (2002a). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291.
- Lashuel, H.A., Petre, B.M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R.J., Walz, T., and Lansbury, P.T., Jr. (2002b). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 322, 1089- 1102.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., and Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420.
- Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (1998). Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18, 30-38.
- Lee, S., Carson, K., Rice-Ficht, A., and Good, T. (2006). Small heat shock proteins differentially affect Abeta aggregation and toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 527-533.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159-162.
- Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois, University of Illinois Press*, 22-24.
- Li, J., and Li, W.X. (2006). A novel function of Drosophila eIF4A as a negative regulator of Dpp/BMP signalling that mediates SMAD degradation. *Nat Cell Biol* 8, 1407-1414.
- Li, J., and Sha, B. (2004). Peptide substrate identification for yeast Hsp40 Ydj1 by screening the phage display library. *Biol Proced Online* 6, 204-208.
- Li, S.H., Gutekunst, C.A., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J Neurosci* 18, 1261-1269.

- Li, S.H., Schilling, G., Young, W.S., 3rd, Li, X.J., Margolis, R.L., Stine, O.C., Wagster, M.V., Abbott, M.H., Franz, M.L., Ranen, N.G., *et al.* (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* *11*, 985-993.
- Liao, W., Li, X., Mancini, M., and Chan, L. (2006). Proteasome inhibition induces differential heat shock protein response but not unfolded protein response in HepG2 cells. *J Cell Biochem* *99*, 1085-1095.
- Liebler, D.C. (2002a). Identifying protein-protein interactions and protein complexes. Introduction to proteomics, tools for the new biology, 151 - 165.
- Liebler, D.C. (2002b). Proteomic approaches to characterize protein modifications: new tools to study the effects of environmental exposures. *Environ Health Perspect* *110 Suppl 1*, 3-9.
- Lin, H., Bhatia, R., and Lal, R. (2001). Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* *15*, 2433-2444.
- Lin, S.-X., Gangloff, A., Huang, Y.-W., Xie, B. (1999). Electrophoresis of hydrophobic proteins. *Analytica Chimica Acta* *383*, 101-107.
- Lindberg, M.O., and Oliveberg, M. (2007). Malleability of protein folding pathways: a simple reason for complex behaviour. *Curr Opin Struct Biol* *17*, 21-29.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B. (2003). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* *11*, 1453-1459.
- Link, C.D., Fonte, V., Hiester, B., Yerg, J., Ferguson, J., Csontos, S., Silverman, M.A., and Stein, G.H. (2005). Conversion of GFP into a toxic, aggregation-prone protein by C-terminal addition of a short peptide. *J Biol Chem*.
- Loison, F., Debure, L., Nizard, P., le Goff, P., Michel, D., and le Drean, Y. (2006). Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem J* *395*, 223-231.
- Lomas, D.A., and Carrell, R.W. (2002). Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet* *3*, 759-768.
- Lu, J., and Deutsch, C. (2005). Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 1123-1129.
- Lunkes, A., Lindenberg, K.S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.L., and Trottier, Y. (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* *10*, 259-269.
- Lybarger, L., Dempsey, D., Franek, K.J., and Chervenak, R. (1996). Rapid generation and flow cytometric analysis of stable GFP-expressing cells. *Cytometry* *25*, 211-220.
- Malisauskas, M., Ostman, J., Darinskas, A., Zamotin, V., Liutkevicius, E., Lundgren, E., and Morozova-Roche, L.A. (2005). Does the cytotoxic effect of transient amyloid oligomers from common equine lysozyme in vitro imply innate amyloid toxicity? *J Biol Chem* *280*, 6269-6275.
- Marcuccilli, C.J., Mathur, S.K., Morimoto, R.I., and Miller, R.J. (1996). Regulatory differences in the stress response of hippocampal neurons and glial cells after heat shock. *J Neurosci* *16*, 478-485.
- Massey, A.C., Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* *73*, 205-235.
- Mattson, M.P., Begley, J.G., Mark, R.J., and Furukawa, K. (1997). Abeta25-35 induces rapid lysis of red blood cells: contrast with Abeta1-42 and examination of underlying mechanisms. *Brain Res* *771*, 147-153.
- Mauger, A., Kieny, M., Hedayat, I., and Goetinck, P.F. (1983). Tissue interactions in the organization and maintenance of the muscle pattern in the chick limb. *J Embryol Exp Morphol* *76*, 199-215.

- Maynard, C.J., Bottcher, C., Ortega, Z., Smith, R., Florea, B.I., Diaz-Hernandez, M., Brundin, P., Overkleeft, H.S., Li, J.Y., Lucas, J.J., *et al.* (2009). Accumulation of ubiquitin conjugates in a polyglutamine disease model occurs without global ubiquitin/proteasome system impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13986-13991.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., *et al.* (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* **9**, 2197-2202.
- McNaught, K.S., Perl, D.P., Brownell, A.L., and Olanow, C.W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* **56**, 149-162.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 100-105.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2003). Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* **278**, 21517-21525.
- Melkonyan, H., Sorg, C., and Klempf, M. (1996). Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic Acids Res* **24**, 4356-4357.
- Metzger, M.B., Maurer, M.J., Dancy, B.M., and Michaelis, S. (2008). Degradation of a cytosolic protein requires endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *J Biol Chem* **283**, 32302-32316.
- Miller, A.T., Jr., and Gunn, L.D. (1961). Identification of mitochondria by osmotic swelling and tetrazolium staining. *Am J Physiol* **200**, 89-93.
- Minami, Y., Hohfeld, J., Ohtsuka, K., and Hartl, F.U. (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem* **271**, 19617-19624.
- Monoi, H., Futaki, S., Kugimiya, S., Minakata, H., and Yoshihara, K. (2000). Poly-L-glutamine forms cation channels: relevance to the pathogenesis of the polyglutamine diseases. *Biophys J* **78**, 2892-2899.
- Montgomery, D.L., Morimoto, R.I., and Giersch, L.M. (1999). Mutations in the substrate binding domain of the Escherichia coli 70 kDa molecular chaperone, DnaK, which alter substrate affinity or interdomain coupling. *J Mol Biol* **286**, 915-932.
- Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**, 3788-3796.
- Morimoto, R.I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* **22**, 1427-1438.
- Mu, T.W., Ong, D.S., Wang, Y.J., Balch, W.E., Yates, J.R., 3rd, Segatori, L., and Kelly, J.W. (2008). Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell* **134**, 769-781.
- Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K., and Hartl, F.U. (2000). Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7841-7846.
- Mulder, G.J. (1839). Ueber die Zusammensetzung einiger thierischer Substanzen. *Journal für praktische Chemie* **16**, 129.
- Mullis, K., Falooma, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.

- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2, 1133-1138.
- Naoi, M., Maruyama, W., Yi, H., Inaba, K., Akao, Y., and Shamoto-Nagai, M. (2009). Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival. *J Neural Transm* 116, 1371-1381.
- Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823.
- Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Pino, M.S., Highshaw, R.A., Andtbacka, R.H., Dunner, K., Jr., Pal, A., Bornmann, W.G., Chiao, P.J., Huang, P., et al. (2006). Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 66, 3773-3781.
- Nesterov, E.E., Skoch, J., Hyman, B.T., Klunk, W.E., Bacskai, B.J., and Swager, T.M. (2005). In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 5452-5456.
- Netzer, W.J., and Hartl, F.U. (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* 388, 343-349.
- Nilsson, M.R., Driscoll, M., and Raleigh, D.P. (2002). Low levels of asparagine deamidation can have a dramatic effect on aggregation of amyloidogenic peptides: implications for the study of amyloid formation. *Protein Sci* 11, 342-349.
- Novikoff, A.B., Shin, W.Y., and Drucker, J. (1961). Mitochondrial localization of oxidative enzymes: staining results with two tetrazolium salts. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 47-61.
- Nucifora, F.C., Jr., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., et al. (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291, 2423-2428.
- O'Connor, T., Sadleir, K.R., Maus, E., Velliquette, R.A., Zhao, J., Cole, S.L., Eimer, W.A., Hitt, B., Bembinster, L.A., Lammich, S., et al. (2008). Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* 60, 988-1009.
- O'Neillain, B., and Wetzel, R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1485-1490.
- Ogawa, H., Nakano, M., Watanabe, H., Starikov, E.B., Rothstein, S.M., and Tanaka, S. (2008). Molecular dynamics simulation study on the structural stabilities of polyglutamine peptides. *Comput Biol Chem* 32, 102-110.
- Oh, H.J., Chen, X., and Subjeck, J.R. (1997). Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermostability. *J Biol Chem* 272, 31636-31640.
- Oh, H.J., Easton, D., Murawski, M., Kaneko, Y., and Subjeck, J.R. (1999). The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J Biol Chem* 274, 15712-15718.
- Ohgushi, M., and Wada, A. (1983). 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Lett* 164, 21-24.
- Olanow, C.W., Perl, D.P., DeMartino, G.N., and McNaught, K.S. (2004). Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3, 496- 503.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386.
- Ong, S.E., and Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* 1, 2650-2660.

- Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (2001). SCA1 molecular genetics: a history of a 13 year collaboration against glutamines. *Hum Mol Genet* *10*, 2307-2311.
- Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W., and Hartl, F.U. (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* *341*, 125-130.
- Outeiro, T.F., and Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* *302*, 1772-1775.
- Perez, M.K., Paulson, H.L., Pendse, S.J., Saionz, S.J., Bonini, N.M., and Pittman, R.N. (1998). Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* *143*, 1457-1470.
- Peters, J.M., Franke, W.W., and Kleinschmidt, J.A. (1994). Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* *269*, 7709-7718.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* *70*, 503-533.
- Pieri, L., Bucciantini, M., Nosi, D., Formigli, L., Savistchenko, J., Melki, R., and Stefani, M. (2006). The yeast prion Ure2p native-like assemblies are toxic to mammalian cells regardless of their aggregation state. *J Biol Chem* *281*, 15337-15344.
- Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., and Ross, C.A. (2002). Huntington spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J Biol Chem* *277*, 41032-41037.
- Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F.U., and Bracher, A. (2008). Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell* *133*, 1068-1079.
- Poot, M., Zhang, Y.Z., Kramer, J.A., Wells, K.S., Jones, L.J., Hanzel, D.K., Lugade, A.G., Singer, V.L., and Haugland, R.P. (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem* *44*, 1363-1372.
- Popowicz, G.M., Schleicher, M., Noegel, A.A., and Holak, T.A. (2006). Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* *31*, 411-419.
- Preisinger, E., Jordan, B.M., Kazantsev, A., and Housman, D. (1999). Evidence for a recruitment and sequestration mechanism in Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *354*, 1029-1034.
- Prouty, W.F., and Goldberg, A.L. (1972). Fate of abnormal proteins in *E. coli* accumulation in intracellular granules before catabolism. *Nat New Biol* *240*, 147-150.
- Prouty, W.F., Karnovsky, M.J., and Goldberg, A.L. (1975). Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs. *J Biol Chem* *250*, 1112-1122.
- Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* *15*, 2083-2093.
- Qin, H., Raught, B., Sonenberg, N., Goldstein, E.G., and Edelman, A.M. (2003). Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* *278*, 48570-48579.
- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., and Lal, R. (2005). Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 10427-10432.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., and Deber, C.M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1760-1765.

- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J., Brown, S.D., and Rubinsztein, D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet* 37, 771-776.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11, 1107-1117.
- Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C., Menzies, F.M., Narayanan, U., Renna, M., *et al.* (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci* 122, 1707-1711.
- Ravikumar, B., Imarisio, S., Sarkar, S., O'Kane, C.J., and Rubinsztein, D.C. (2008). Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. *J Cell Sci* 121, 1649-1660.
- Raviol, H., Sadlish, H., Rodriguez, F., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2006). Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J* 25, 2510-2518.
- Raychaudhuri, S., Dey, S., Bhattacharyya, N.P., and Mukhopadhyay, D. (2009). The role of intrinsically unstructured proteins in neurodegenerative diseases. *PLoS One* 4, e5566.
- Raynaud, F., and Marcilhac, A. (2006). Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *FEBS J* 273, 3437-3443.
- Recillas-Targa, F. (2004). Gene transfer and expression in mammalian cell lines and transgenic animals. *Methods Mol Biol* 267, 417-433.
- Rehr, S.S., Janzen, D.H., and Feeny, P.P. (1973). L-Dopa in Legume Seeds: A Chemical Barrier to Insect Attack. *Science* 181, 81-82.
- Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2002). Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2754-2759.
- Richmond, M.H. (1962). The effect of amino acid analogues on growth and protein synthesis in microorganisms. *Bacteriol Rev* 26, 398-420.
- Rickwood, D., Hames, B. D. (1990). Gel electrophoresis of nucleic acids. IRL Press.
- Rideout, H.J., Lang-Rollin, I., and Stefanis, L. (2004). Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2551-2562.
- Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A., Hayden, M.R., Li, Y., *et al.* (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 20, 3705-3713.
- Riley, B.E., and Orr, H.T. (2006). Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20, 2183-2192.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Rosenbaum, D.M., Roy, S., Hecht, M.H. (1999). Screening combinatorial libraries of de novo proteins by hydrogen-deuterium exchange and electrospray mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 121, 9509-9513.
- Rosenthal, G.A., Dahlman, D.L., and Janzen, D.H. (1976). A novel means for dealing with L-canavanine, a toxic metabolite. *Science* 192, 256-258.
- Ross, C.A., Margolis, R.L., Reading, S.A., Pletnikov, M., and Coyle, J.T. (2006). Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52, 139-153.
- Ross, C.A., and Pickart, C.M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* 14, 703-711.
- Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl, S10-17.
- Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2005). Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 891-898.

- Roy, S., and Hecht, M.H. (2000). Cooperative thermal denaturation of proteins designed by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Biochemistry* 39, 4603-4607.
- Roy, S., Helmer, K.J., and Hecht, M.H. (1997). Detecting native-like properties in combinatorial libraries of de novo proteins. *Fold Des* 2, 89-92.
- Rubenstein, E. (2000). Biologic effects of and clinical disorders caused by nonprotein amino acids. *Medicine (Baltimore)* 79, 80-89.
- Rubinsztein, D.C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R.A., Qin, Z.H., Ravikumar, B., Stefanis, L., and Tolokovsky, A. (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* 1, 11-22.
- Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J.J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., et al. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* 59, 16-22.
- Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* 16, 1501-1507.
- Saiki, M., Honda, S., Kawasaki, K., Zhou, D., Kaito, A., Konakahara, T., and Morii, H. (2005). Higher-order molecular packing in amyloid-like fibrils constructed with linear arrangements of hydrophobic and hydrogen-bonding side-chains. *J Mol Biol* 348, 983-998.
- Saito, Y., Yamagishi, N., Ishihara, K., and Hatayama, T. (2003). Identification of alpha-tubulin as an hsp105alpha-binding protein by the yeast two-hybrid system. *Exp Cell Res* 286, 233-240.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001). *Molekulare Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb Laboratory Press.
- Sarkar, S., Perlstein, E.O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R.L., Webster, J.A., Lewis, T.A., O'Kane, C.J., Schreiber, S.L., et al. (2007). Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol* 3, 331-338.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55-66.
- Schaffar, G., Breuer, P., Boteva, R., Behrends, C., Tzvetkov, N., Strippel, N., Sakahira, H., Siegers, K., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2004). Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: Mechanism of transcription factor deactivation. *Molecular Cell* 15, 95-105.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90, 549-558.
- Schiffer, N.W., Broadley, S.A., Hirschberger, T., Tavan, P., Kretzschmar, H.A., Giese, A., Haass, C., Hartl, F.U., and Schmid, B. (2007). Identification of anti-prion compounds as efficient inhibitors of polyglutamine protein aggregation in a zebrafish model. *J Biol Chem* 282, 9195-9203.
- Schleiden, M.J. (1838). Einige Bemerkungen über den vegetabilischen Faserstoff und sein Verhältnis zum Stärkemehl. *Annu Physik u Chemie* 43.
- Schlunegger, M.P., Bennett, M.J., and Eisenberg, D. (1997). Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. *Adv Protein Chem* 50, 61-122.

- Schmidt, U., Wochnik, G.M., Rosenhagen, M.C., Young, J.C., Hartl, F.U., Holsboer, F., and Rein, T. (2003). Essential role of the unusual DNA-binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 278, 4926-4931.
- Schneider, T.D., and Stephens, R.M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18, 6097-6100.
- Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739-789.
- Schultz, C.P. (2000). Illuminating folding intermediates. *Nat Struct Biol* 7, 7-10.
- Serpell, L.C., Sunde, M., Benson, M.D., Tennent, G.A., Pepys, M.B., and Fraser, P.E. (2000). The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol* 300, 1033-1039.
- Shamovsky, I., and Nudler, E. (2008). New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cell Mol Life Sci* 65, 855-861.
- Sharma, S., Chakraborty, K., Muller, B.K., Astola, N., Tang, Y.C., Lamb, D.C., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2008). Monitoring protein conformation along the pathway of chaperonin-assisted folding. *Cell* 133, 142-153.
- Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzuk, J.A., Steiner, J.P., Lo, A., et al. (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14, 1065-1074.
- Shearman, M.S., Hawtin, S.R., and Tailor, V.J. (1995). The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides. *J Neurochem* 65, 218-227.
- Sherman, M.Y., and Goldberg, A.L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.
- Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S.P., and Kosik, K.S. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279, 4869-4876.
- Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U., and Wanker, E.E. (2001). Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10, 1307-1315.
- Skrabana, R., Sevcik, J., and Novak, M. (2006). Intrinsically disordered proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1085-1097.
- Smit, J.W., Meijer, C.J., Decary, F., and Feltkamp-Vroom, T.M. (1974). Paraformaldehyde fixation in immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Preservation of tissue and cell surface membrane antigens. *J Immunol Methods* 6, 93-98.
- Sonenberg, N., and Dever, T.E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* 13, 56-63.
- Stanley, P.E. (1993). A survey of some commercially available kits and reagents which include bioluminescence or chemiluminescence for their operation: Products from more than forty companies. *J Biolumin Chemilumin* 8, 51-63.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., and Pavletich, N.P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Stefani, M., and Dobson, C.M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 81, 678- 699.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., et al. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304, 100-104.

- Steffan, J.S., Kazantsev, A., (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6763-6768.
- Steinbock, F.A., and Wiche, G. (1999). Plectin: a cytolinker by design. *Biol Chem* 380, 151-158.
- Sticht, H., Bayer, P., Willbold, D., Dames, S., Hilbich, C., Beyreuther, K., Frank, R.W., and Rosch, P. (1995). Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. *Eur J Biochem* 233, 293-298.
- Storch, A., Ludolph, A.C., and Schwarz, J. (1999). HEK-293 cells expressing the human dopamine transporter are susceptible to low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) via impairment of energy metabolism. *Neurochem Int* 35, 393-403.
- Strong, T.V., Tagle, D.A., Valdes, J.M., Elmer, L.W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K.W., Collins, F.S., and Albin, R.L. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneuronal tissues. *Nat Genet* 5, 259-265.
- Sunde, M., and Blake, C.C. (1998). From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Q Rev Biophys* 31, 1-39.
- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B., and Blake, C.C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273, 729-739.
- Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2008). Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17, 345-356.
- Tam, S., Geller, R., Spiess, C., and Frydman, J. (2006). The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat Cell Biol* 8, 1155-1162.
- Tan, S.Y., and Pepys, M.B. (1994). Amyloidosis. *Histopathology* 25, 403-414.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J.S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428, 323-328.
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R.K., Wanner, T., Tanzi, R.E., Sawa, A., V, L.D., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (2001). Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 10, 919-926.
- Tartaglia, G.G., and Vendruscolo, M. (2008). The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chem Soc Rev* 37, 1395-1401.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30, 572-580.
- Tetzlaff, J.E., Putcha, P., Outeiro, T.F., Ivanov, A., Berezhovska, O., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2008). CHIP targets toxic alpha-Synuclein oligomers for degradation. *J Biol Chem* 283, 17962-17968.
- Thomas, P., and Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51, 187-200.
- Thulasiraman, V., Yang, C.F., and Frydman, J. (1999). In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. *EMBO J* 18, 85-95.
- Tompkins, M.M., and Hill, W.D. (1997). Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res* 775, 24-29.
- Topisirovic, I., Culjkovic, B., Cohen, N., Perez, J.M., Skrabaneck, L., and Borden, K.L. (2003). The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J* 22, 689-703.

- Trotter, E.W., Berenfeld, L., Krause, S.A., Petsko, G.A., and Gray, J.V. (2001). Protein misfolding and temperature up-shift cause G1 arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7313-7318.
- Truant, R., Atwal, R.S., and Burtnik, A. (2007). Nucleocytoplasmic trafficking and transcription effects of huntingtin in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* *83*, 211-227.
- Tsai, F.H., Overberger, C.G., and Zand, R. (1990). Synthesis and peptide bond orientation in tetrapeptides containing L-azetidine-2-carboxylic acid and L-proline. *Biopolymers* *30*, 1039-1049.
- Uversky, V.N. (2003). A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J Biomol Struct Dyn* *21*, 211-234.
- Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta* *1698*, 131-153.
- Vabulas, R.M., and Hartl, F.U. (2005). Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* *310*, 1960-1963.
- Vainberg, I.E., Lewis, S.A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H.L., and Cowan, N.J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* *93*, 863-873.
- Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 944-957.
- Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., and Goldberg, A.L. (2004). Eukaryotic Proteasomes Cannot Digest Polyglutamine Sequences and Release Them during Degradation of Polyglutamine-Containing Proteins. *Mol Cell* *14*, 95-104.
- Verderame, M., Alcorta, D., Egnor, M., Smith, K., and Pollack, R. (1980). Cytoskeletal F-actin patterns quantitated with fluorescein isothiocyanate-phalloidin in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 6624-6628.
- Verhoef, L.G., Lindsten, K., Masucci, M.G., and Dantuma, N.P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet* *11*, 2689-2700.
- Virchow, H. (1854). Zur Cellulose-Frage. *Virchows Arch Path Anat* *6*.
- Vitalis, A., Wang, X., and Pappu, R.V. (2007). Quantitative characterization of intrinsic disorder in polyglutamine: insights from analysis based on polymer theories. *Biophys J* *93*, 1923-1937.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* *68*, 1015-1068.
- Volles, M.J., and Lansbury, P.T., Jr. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* *41*, 4595-4602.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P., Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* *44*, 559-577.
- Wacker, J.L., Zareie, M.H., Fong, H., Sarikaya, M., and Muchowski, P.J. (2004). Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 1215-1222.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* *274*, 25945-25952.

- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002a). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* *416*, 535- 539.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002b). Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans* *30*, 552-557.
- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2004). Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* *11*, 213-228.
- Wandinger, S.K., Richter, K., and Buchner, J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* *283*, 18473-18477.
- Wang, J., Farr, G.W., Zeiss, C.J., Yates, J.R., 3rd, et al. (2009). Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1392-1397.
- Wang, R., and Brattain, M.G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett* *581*, 3164-3170.
- Wang, W., and Hecht, M.H. (2002). Rationally designed mutations convert de novo amyloid-like fibrils into monomeric beta-sheet proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2760-2765.
- Wanker, E.E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., and Lehrach, H. (1997). HIP-1: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet* *6*, 487-495.
- Waxman, E.A., and Giasson, B.I. (2009). Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* *1792*, 616-624.
- Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Tanaka, F., Inukai, A., Doyu, M., and Sobue, G. (2005). 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat Med* *11*, 1088-1095.
- Wegrzyn, R.D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C., and Deuerling, E. (2006). A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J Biol Chem* *281*, 2847-2857.
- Wei, Y., Kim, S., Fela, D., Baum, J., and Hecht, M.H. (2003a). Solution structure of a de novo protein from a designed combinatorial library. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13270- 13273.
- Wei, Y., Liu, T., Sazinsky, S.L., Moffet, D.A., Pelczer, I., and Hecht, M.H. (2003b). Stably folded de novo proteins from a designed combinatorial library. *Protein Sci* *12*, 92-102.
- Weissmann, C. (2005). Birth of a prion: spontaneous generation revisited. *Cell* *122*, 165-168.
- Welnowska, E., Castello, A., Moral, P., and Carrasco, L. (2009). Translation of mRNAs from vesicular stomatitis virus and vaccinia virus is differentially blocked in cells with depletion of eIF4GI and/or eIF4GII. *J Mol Biol* *394*, 506-521.
- Welte, M.A. (2007). Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol* *17*, 363-369.
- Werner, E.D., Brodsky, J.L., and McCracken, A.A. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13797-13801.
- West, M.W., Wang, W., Patterson, J., Mancias, J.D., Beasley, J.R., and Hecht, M.H. (1999). De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11211-11216.
- Westerheide, S.D., Bosman, J.D., Mbadugha, B.N., Kawahara, T.L., Matsumoto, G., Kim, S., Gu, W., Devlin, J.P., Silverman, R.B., and Morimoto, R.I. (2004). Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection. *J Biol Chem* *279*, 56053- 56060.

- Westerheide, S.D., and Morimoto, R.I. (2005). Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem* *280*, 33097-33100.
- Westermark, P., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Cohen, A.S. (2005). Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* *12*, 1-4.
- White, J.K., Auerbach, W., Duyao, M.P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., and MacDonald, M.E. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* *17*, 404-410.
- Williams, G.T., McClanahan, T.K., and Morimoto, R.I. (1989). E1a transactivation of the human HSP70 promoter is mediated through the basal transcriptional complex. *Mol Cell Biol* *9*, 2574-2587.
- Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., and Haass, C. (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* *27*, 336-349.
- Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2006). The role of chaperones in Parkinson's disease and prion diseases. *Handb Exp Pharmacol*, 221-258.
- Wiseman, R.L., Powers, E.T., Buxbaum, J.N., Kelly, J.W., and Balch, W.E. (2007). An adaptable standard for protein export from the endoplasmic reticulum. *Cell* *131*, 809-821.
- Wolynes, P.G., Onuchic, J.N., and Thirumalai, D. (1995). Navigating the folding routes. *Science* *267*, 1619-1620.
- Wood, J.D., Beaujeux, T.P., and Shaw, P.J. (2003). Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* *29*, 529-545.
- Wood, K.V. (1998). The chemistry of bioluminescent reporter assays. *Promega Notes* *65*, 14-20.
- Wright, C.F., Teichmann, S.A., Clarke, J., and Dobson, C.M. (2005). The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature* *438*, 878-881.
- Wytttenbach, A., Sauvageot, O., Carmichael, J., Diaz-Latoud, C., Arrigo, A.P., and Rubinsztein, D.C. (2002). Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* *11*, 1137-1151.
- Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., and Truant, R. (2003). Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet* *12*, 1393-1403.
- Xiong, H., Buckwalter, B.L., Shieh, H.M., and Hecht, M.H. (1995). Periodicity of polar and nonpolar amino acids is the major determinant of secondary structure in self-assembling oligomeric peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 6349-6353.
- Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y., and Hatayama, T. (2003). Hsp105 but not Hsp70 family proteins suppress the aggregation of heat-denatured protein in the presence of ADP. *FEBS Lett* *555*, 390-396.
- Yamamoto, A., Lucas, J.J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* *101*, 57-66.
- Yamashita, H., Kawamata, J., Okawa, K., Kanki, R., Nakamizo, T., Hatayama, T., Yamanaka, K., Takahashi, R., and Shimohama, S. (2007). Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase: clues to a possible strategy for treating ALS. *J Neurochem* *102*, 1497-1505.
- Yoshiike, Y., Akagi, T., and Takashima, A. (2007). Surface structure of amyloid-beta fibrils contributes to cytotoxicity. *Biochemistry* *46*, 9805-9812.
- Zagari, A., Palmer, K.A., Gibson, K.D., Nemethy, G., and Scheraga, H.A. (1994). The effect of the l-azetidine-2-carboxylic acid residue on protein conformation. IV. Local substitutions in the collagen triple helix. *Biopolymers* *34*, 51-60.

- Zhang, Q., Powers, E.T., Nieva, J., Huff, M.E., Dendle, M.A., Bieschke, J., Glabe, C.G., Eschenmoser, A., Wentworth, P., Jr., Lerner, R.A., *et al.* (2004). Metabolite-initiated protein misfolding may trigger Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4752-4757.
- Zhang, Y., Li, M., Drozda, M., Chen, M., Ren, S., Mejia Sanchez, R.O., Leavitt, B.R., *et al.* (2003). Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases. *J Neurochem* **87**, 101-106.
- Zhou, M., Sandercock, A.M., Fraser, C.S., Ridlova, G., Stephens, E., Schenauer, M.R., Yokoi-Fong, T., Barsky, D., Leary, J.A., Hershey, J.W., *et al.* (2008). Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18139-18144.
- Zuccato, C., Ciampola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., *et al.* (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**, 493-498.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmus, T., *et al.* (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* **35**, 76-83.

## 7. Abkürzungen

A	1. Adenin; 2. Amyloid; 3. Ampère
$\alpha$	1. anti; 2. Sekundärstrukturelement
$\text{\AA}$	$\text{\AAngström}$ ( $1 \text{\AA} = 0,1 \text{ nm}$ )
AA	Amyloidose unter Beteiligung des Serum amyloiden Proteins A
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumhydrogencarbonat ( <b>ammonium bi-carbonate</b> )
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Ak	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANS	8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure
AO	Akridinorange
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammnoniumpersulfat
APT	Aminoglykosid-Phosphotransferase
As	Aminosäure
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
Azc	L-Azetidin-2-carbonsäure
$\beta$	1. Massenkonzentration [g/l]; 2. Stellung von Substituenten am 2. C-Atom; 3. Sekundärstrukturelement
BAG	BCL2 assoziiertes Athanogen
BCL2	B-cell lymphoma 2
BiP	Binding immunoglobulin protein
Bis-Tris	[2,2-Bis-(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol]
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool,
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	1. Carboxy-, Kohlenstoff-; 2. Cytosin; 3. Kapazität (Capacitas)
c	1. cellular, zellulär; 2. Stoffmengenkonzentration in mol/l
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
C4	Tetracystein
Carboxy-H <sub>2</sub> DCFDA	5-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoreszeindiacetat
CCD	Charge-coupled device
CCT	Chaperonin-containing TCP1
CD	Circular dichroismus
cDNS	komplementäre DNS (complementary DNA)
CID	Collision induced dissociation
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFU	Kolonie formende Einheit, colony forming unit
Chaps	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfat)
CHIP	Carboxy-Terminus von Hsp70 interagierendes Protein
CHX	Cycloheximid
CL1	Clone 1, spezifischer Klon aus einer Studie über Degrons in Hefe

---

CMA	Chaperon vermittelte Autophagie ( <b>Chaperone-mediated autophagy</b> )
CMV	Cytomegalievirus
COPII	Coat protein complex II
CPE	Cytopathischer Effekt
d	desoxy-
Δ	Deletion
DNA	Desoxyribonucleic acid
DnaJ	DNA-replicon Lokus J
DnaK	DNA-replicon Lokus K
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamindino-2-Phenylindol
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
0-DMEM, 10-DMEM	DMEM ohne bzw. mit 10 % FCS
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	desoxy-Ribonukleotidtriphosphate
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DRPLA	Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie
DsRed	Discosoma Spezies („red“) rotes fluoreszierendes Protein
DTT	Dithiothreitol
E	1. Enzym; 2. Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECS	Eisenberg-Consensus-Skala
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
EPS	Electrophoresis power supply
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic reticulum associated protein degradation
esiRNA	endoribonuclease-prepared short interfering ribonucleic acid
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1-H	Fluoreszenz Kanal 1 Höhe, Intensität des grünen Kanals beim FACS
FlAsH	Fluorescein Arsenical Hairpin
FSC	Forward scatter
g	1. Gramm; 2. Einheit der Gravitationskraft
G	Guanin
G418	Geneticin 418
GABA	γ-Aminobutyric acid (γ-Aminobuttersäure)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

---

---

ggf.	gegebenenfalls
GM130	Golgi-Matrix-Protein der Molmasse 130 kDa
GroEL/GroES	Chaperonine essential for <b>growth</b> with large and small subunit
h	1. Stunde ( <b>hora</b> ); 2. <b>human</b>
HA	<b>Hämaggglutinin</b>
HD	Chorea Huntington, Veitstanz ( <b>Huntington's disease</b> )
HDL	High <b>density lipoprotein</b>
HEAT	Gefunden in <b>Huntingtin</b> , Elongation factor 3, Protein phosphatase 2A und Target of Rapamycin 1
HEPES	<b>N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure</b>
HEK293T	<b>Human embryonic kidney</b> 293 Zellen, die das Large <b>T</b> Antigen des simianen Virus 40 stabil exprimieren
HeLa	Cervikale Karzinomzellen, <b>Henrietta Lacks</b> entnommen
Hip	<b>Huntingtin interagierendes Protein</b>
HPRD	<b>Human Proteome Reference Data Base</b>
His	<b>Histidin</b>
HRP	Meerrettichperoxidase ( <b>horse radish peroxidase</b> )
HS	<b>Hitzeschock</b>
Hsc	<b>Heat shock protein, constitutively expressed</b>
HSE	<b>Heat shock response element</b>
HSF	<b>Hitzeschockfaktor</b>
Hsp	<b>Hitzeschockprotein</b>
HSR	<b>Heat shock response</b>
Htt	<b>Huntingtin</b>
I	<b>Stromstärke</b>
Ig	<b>Immunglobulin</b>
IL	<b>Interleukin</b>
InsP <sub>3</sub>	<b>Inositol-1,4,5-trisphosphat</b>
IP	<b>Immunpräzipitation</b>
IPOD	<b>Insoluble protein deposit</b>
IRES	Interne <b>ribosomal Eintrittsstelle</b> (internal ribosomal entry site)
IUP	<b>Intrinsisch unstrukturiertes Protein</b>
IUR	<b>Intrinsisch unstrukturierte Region</b>
JUNQ	<b>Juxta-nuclear quality control compartment</b>
k	<b>Kilo</b> ( $x \cdot 10^3$ )
KAc	<b>Kaliumacetat</b>
kb	<b>Kilobase</b> ( $x \cdot 10^3$ Basen)
l	<b>Liter</b>
$\lambda$	<b>Wellenlänge</b>
LB	<b>Luria-Bertani</b>
LC	<b>Liquid Chromatography</b>
LDS	<b>Lithiumdodecylsulfat</b>
Luc	<b>Luciferase</b>
m	1. <b>Meter</b> ; 2. <b>milli</b> ( $x \cdot 10^{-3}$ ); 3. <b>monoklonal</b> ; 4. <b>murin</b>
M	1. <b>Molar</b> (mol/l); 2. <b>Mega-</b> ( $x \cdot 10^6$ ); 3. <b>Morbus</b> (Krankheit)
$\mu$	<b>mikro</b> ( $x \cdot 10^{-6}$ )
MCS	multiple Klonierungsstelle, Polylinker ( <b>multiple cloning site</b> )
$\beta$ -ME	<b><math>\beta</math>-Mercaptoethanol</b>
MEM	<b>Modified Eagle's Medium</b>
MetOH	<b>Methanol</b>
min.	<b>Minute</b>

---

---

MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Myc	zelluläres Homolog zum Onkogen des Myelocytomatose-Virus
MW	Molmasse in g/mol ( <b>Molecular Weight</b> )
n	nano ( $x \cdot 10^{-9}$ )
N	1. Amino-; 2. Normalität (Äquivalentkonzentration)
N2a	Neuro-2a
NAC	Nascent-polypeptide-associated complex
NEF	Nucleotide exchange factor
NEM	N-Ethylmaleimid
NES	Nukleäres Exportsignal
NIAD-4	[[5'-(4-Hydroxyphenyl)-[2,2'-bithiophen]-5-yl]-methylen]-propandinitril
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
p	pico ( $x \cdot 10^{-12}$ )
P	1. Prolin; 2. Penicillin; 3. Phosphat
PA	Polyacrylamid
p. a.	pro analysi (Reinheitsgrad für die Analyse)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS-B	Phosphat gepufferte Salzlösung mit BSA ( <b>phosphate buffered saline with BSA</b> )
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween-20 ( <b>phosphate buffered saline with Tween-20</b> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <b>Polymerase chain reaction</b> )
PEG	Polyethylenglykol
PES	Peroxisomale Eintrittssequenz ( <b>Peroxisomal entry site</b> )
PFD	Prefoldin
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
pH	Potentia hydrogenii
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
Q	Glutamin
R	Widerstand ( <b>Resistance</b> )
RAC	Ribosome associated complex
RCF	Relative Centrifugation Force
RGB	Rot Grün Blau, Farbformat
RIP	Ribosomen inaktivierendes Protein
RLU	Relative Lichteinheit ( <b>relative light unit</b> )
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	Ribonucleic acid interference
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
Rpt1	Regulatory particle ATPase 1
RT	Raumtemperatur
S	Streptomycin
SAA	Serum amyloid Protein A
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SBMA	Spinobulbuläre Muskelatrophie

---

---

SCOP	Strukturelle Proteinklassifikation (structural classification of proteins)
SDS	Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Sideward scatter
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
T	Thymin
$\theta$	Temperatur in °C
Tab.	<b>Tabelle</b>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TBS	TRIS-buffered saline
TBS-T	TRIS-buffered saline with Tween-20
TCA	Trichloressigsäure (Trichloroacetic acid)
TCP1	Tailless complex peptide 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Triggerfaktor
TFA	Trifluoressigsäure (Trifluoroacetic acid)
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosisfaktor $\alpha$
TRiC	TCP1 Ring-complex
TRIS	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
ü. N.	über Nacht
U	1. Unit, Einheit; 2. Stromspannung
UPR	Unfolded protein response
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDAC	Voltage-dependent anion-selective channel
VIS	Visible
vs.	versus
v/v	Volumen/Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Weight/Volume
ZNS	Zentralnervensystem

---

## 8. Anhang

### 8.1 Anhang A: Geräteliste

Analysenwaage AB265-S/FACT	Mettler Toledo(Gießen, Deutschland)
Autoklav	Getinge (Getinge, Schweden)
Brutschrank Bakterienkulturen	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Bunsenbrenner	Schütt (Göttingen, Deutschland)
Deionisierungssystem, MilliQ plus PF	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Einschweißgerät	GEHO Pack Service GmbH, Halstenbek
FACS FACSCalibur	BD (San José, USA)
Filter Millex SV, Porengröße 0,22 µm	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Filter Steritop GP, Porengröße 0,22 µm	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Fraktionator f. Gradienten	Uniequip (Martinsried, Deutschland)
Auto-Densi-Flow	
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Gefrierschrank -80 °C	Forma Scientific (New York, USA)
Gel-Dokumentationssystem BioCapt	MWG BiotechAG (Göttingen, Deutschland)
Gelfiltrationssäule Superose 6	Amersham Bioscience (Freiburg, Deutschland)
Gelfiltrations-System SMART	Amersham Bioscience (Freiburg, Deutschland)
Gel imaging AIDA software version 2.31	Raytest (Straubenhardt, Deutschland)
Gradientendrehtisch Gradient Master Biocomp	Biocomp (Pfinztal, Deutschland)
Glasspritze, Hamilton 710 NR, 100 µl	Hamilton (Reno, USA)
Heizblock	Störk Tronic (Stuttgart, Deutschland)
Inkubator B12	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Inkubator mit CO <sub>2</sub> -Zufuhr	Forma Scientific (Waltham, USA)
Inkubator Innova 4430	New Brunswick Scientific (Nürtingen, Deutschland)
Elektrophorese-Kammern, MiniProtrean 3	BioRad (München, Deutschland)
Elektrophorese-Kammern NuPAGE	Invitrogen (Carlsbad, USA)
XCell SureLock Mini-Cell	
Elektroporationssystem Gene Pulser II	BioRad (München, Deutschland)
mit Küvetten 4 mm	
Laborwaage PB602	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Laborwaage CP3202P	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Leuchttisch VariQuest100	Fotodyne (Hartland, USA)
Lumineszenz Lesegerät	Fujifilm (Tokio, Japan)
Image Reader LAS 3000	
Luminometer Lumat LB9507	EG&G Berthold (Bad Wildbad, Deutschland)
Lyophilisator Speedvac SC110	Savant (New York, USA)
Magnetrührer	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mikrowellengerät R-204	Sharp (Osaka, Japan)
Mikroplatten Lesegerät, Synergy HT	BioTek Instruments (Winooski, USA)
UV/VIS Fluorescence/Luminescence	
Mikroskop Diavert	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop, invertiertes	Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 205	
Mixer Vortex-Genie2	Scientific Industries (New York, USA)
Multipette	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

pH-Meter Accumet Basic	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
pH-Meter pH535	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipetten, Gilson, Pipetman (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Abimed (Langen, Deutschland)
Pipettus	Drummond (Birmingham, USA)
Rotator SB3	Stuart Dynalab (Rochester, USA)
Rotoren Avanti J-20, J6 MI, LE-80K	Beckmann (München, Deutschland)
Schüttler Red Rocker	Hoefer Pharmacia Bioteck Inc. (San Fransisco, USA)
Schüttler Orbital Deutschland)	New Brunswick Scientific (Nürtingen, Germany)
Spektrophotometer UV-VIS DU640	Beckman (München, Deutschland)
Spektrophotometer GeneQuantPro GB)	GE Healthcare BioSciences (Chalfont St. Giles, UK)
Spektrophotometer LS 50	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Sterilbank HeraSafe	Hereaus (Hanau, Deutschland)
Tankblot-System Electrophoretic	BioRad (München, Deutschland)
Thermocycler PCR T3	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermometer	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifugen 5415C und 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Transformator für Elektrophoresen EPS300	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
Transformator für Elektrophoresen PAC300	BioRad (Hercules, USA)
Ultraschallbad Sonorex Super RK103H	Bandelin Elektronik (Berlin, Deutschland)
Ultrazentrifuge Optima TLX Beckmann mit Rotor TLX	(München, Deutschland)
Ultrazentrifuge Optima Le-80K mit 70Ti und SW 41 Ti Rotoren	Beckmann (München, Deutschland)
UV-Tisch	HeroLab (St. Leon, Schweiz)
Vakuumfiltrationseinheit (0,2 µm)	Amicon (Beverly, USA)
Wasserbad	Bioblock Scientific (Frenkendorf, Schweiz)
Zentrifuge Avanti J-25I	Beckmann (München, Deutschland)
Zentrifuge GS-6R	Beckmann (München, Deutschland)

## 8.2 Anhang B: Sonstige Geräte/Verbrauchsmaterialien

Alufolie, extra stark	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Cryo-Boxen	Peske (Aindlingen-Arnhofen, Deutschland)
Cryo-Röhrchen	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dewar-Gefäß	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Filter Millex, 0,20 µm	Millipore (Billerica, USA)
Flaskette (Chamber Slide System)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Glasgeräte, andere	Schott (Mainz, Deutschland)
Handschuhe, Latex	Kimberley Clark (Roswell, USA)
Handschuhe, Nitril	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hybridisierbeutel	Franke Labtec (Hamburg, Deutschland)
Kälte-Schutzhandschuh	Faust Nord (Hamburg, Deutschland)

Kanülen 0,9 und 0,8 x 38 mm	Peske (Aindlingen-Arnhofen, Deutschland)
Küvetten, (PMMA; 1,5 ml halbmikro Deutschland)	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim,
Küvetten, Quartz	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Küvetten f. Elektroporation	BioRad (Hercules, USA)
Laborflaschen, Duran	Schott (Mainz, Deutschland)
Magnetrührstäbchen	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Maßkolben	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Messbecher	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Messzylinder	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nitrocellulose Membran, PROTRAN®	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
Objektträger	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging (Menasha, USA)
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Petrischalen	Nunc, Roskilde, Dänemark
pH-Papier	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Pinzette 18/8, spitz	Bochem Instrumente GmbH (Weilburg, Deutschland)
Pipetten, graduierte, serologisch steril	Corning (New York, USA)
Pipettenspitzen	Peske (Aindlingen-Arnhofen, Deutschland)
Plastikröhrchen 0,5 ml	Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland)
Plastikröhrchen 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Plastikröhrchen 1,8 ml (Kryo-Röhrchen)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Plastikröhrchen 15 ml und 50 ml	Becton-Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Plastikröhrchen, PP, steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
PVDF-Membranen: Immobilon-P, Porengröße 0,45 µm	Millipore Corp (Bedford, USA)
Skalpell mit Klinge separat	Bayha (Tuttlingen, Deutschland)
Spritzen, Plastik	Peske (Aindlingen-Arnhofen, Deutschland)
Sterilfilter	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Sterilfilter, Flasche 100 ml	Nalge Company, Rochester/New York, USA
Tauchkammern für die Immunhistochemie	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Vernichtungsbeutel	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Wägepapier, MN 226	Macherey-Nagel (MN), Düren
Wägeschiffchen	Wilcke & Witzel, Hamburg
Wattestäbchen, kleiner Kopf	Beese Verbandstoffe, Barsbüttel
Whatman-Papier	Whatman, Kent, UK
Zellkulturflasche, Kulturoberfläche 80 cm <sup>2</sup>	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen rund, Durchmesser 15 cm	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zählkammer nach Neubauer	OptikLabor (Balgach, Schweiz)
Zellschaber	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenbecher, 200 ml + Deckel	DuPont, Wilmington, USA
Zentrifugenbehälter, 50 ml + Deckel	DuPont, Wilmington, USA
Zentrifugenröhrchen	Peske (Aindlingen-Arnhofen, Deutschland)
Zentrifugensäulen mit Filter	MoBiTec (Göttingen, Deutschland)
Zerstäuber HDPE	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
ZipTipC18	Millipore (Bedford, USA)

### 8.3 Anhang C: Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Acetonitril	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Acrylamid : Bisacrylamid; 29 : 1; 40 %	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Agar	Fluka (Buchs, Schweiz)
Agarose LE	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
Akridinorange	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Albumin Fraktion V	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Ampicillin-Natriumsalz	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ANS	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Aprotinin	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
L-Azetidin-2-carbonsäure	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto-Hefeextrakt	Difco (Detroit, USA)
Bacto-Trypton	Difco (Detroit, USA)
Bis-Tris	Fluka (Buchs, Schweiz)
Blue Dextran 2000	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Brillant Blue G	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Bromphenolblau, Natriumsalz	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Bromthymolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
BSA Standard	Pierce (Rockford, USA)
2-Butanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Calciumacetat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Celastrol	Calbiochem (La Jolla, USA)
Citronensäure-Monohydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chaps	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Congo-Rot	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Coomassie ServaBlue R	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Basel, Schweiz)
Cycloheximid	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
DAPI	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylformamid (DMF)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dinatriumhydrogensulfat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Ethanol absolut p. a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylenglykol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Ethidiumbromid (EtBr)	BioRad (München, Deutschland)
FACSFlow™	BD (San José, USA)
Ficoll®400	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formamid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Gentamycin	Gibco (Carlsbad, USA)

Geneticin (G418)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Glutaraldehyd	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
HEPES	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Hygromycin B	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Immersionsöl	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Iodacetamid	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Kaliumacetat (KAc)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumcarbonat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Kaliumcyanid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Lactacystin	Calbiochem (La Jolla, USA)
LDS 4x Probenpuffer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Leupeptin	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Magermilchpulver	Gabler & Saliter (Obergünzburg, Deutschland)
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol p. a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol technisch	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
3-Methyladenin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
MG132	BioMol (Hamburg, Deutschland)
Mineralöl	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
MTT	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdesoxycholat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natrium-Ethyldiamintetraessigacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumiodid	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natrium-Kalium-Tartrat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumphosphat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
NIAD-4	ICX Nomadics (Cambridge, USA)
NonidetP40	Amersham (Cleveland, USA)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Pefabloc SC-Protease-Inhibitor (AEBSF)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
PIPES	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
PMSF	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Polyethylenglykol 4000	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Propan-1,2-diol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
1-Propanol p. a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Proteinstandardmarker	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Proteinleiter vorgefärbt	Fermentas
Rhodamin-Phalloidin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Saccharose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Silbernitrat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Staurosporin	Calbiochem (La Jolla, USA)
Stickstoff, flüssiger	Linde (Hamburg, Deutschland)
Streptomycin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Thioflavin S	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Thioflavin T	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
TNF $\alpha$ , human	Gibco (Carlsbad, USA)
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Tris (Trizmabase)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Triton-X-100	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Tween-20	Calbiochem (La Jolla, USA)
Wasser, endotoxinfrei	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Withaferin A	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)

## 8.4 Anhang D: Oligonukleotide und klonierte Konstrukte

Übersicht über klonierte Konstrukte, deren Benennung, sowie die hierfür verwendeten Primer und deren Bezeichnungen.

Name des Oligonukleotids	Basensequenz des Oligonukleotids (5'→3')	Name des klonierten Konstrukts
---	---	pHA-Htt20Q
---	---	pHA-Htt96Q
4-6For	GTAACCTCGAGGTCAACTTC	pMyc-4-6
4-6Rev	GAAGTTGACCTCGAGGTTAC	In #4 K → E
17-6For	GGCCGTGTCCACGTCCACATCC	pMyc-17-6
17-6Rev	GGATGTGGACGTGGACACGGCC	In #17 Q → H
Myc-For	CATGTGTGAACAAAAGCTTATTTC	pMycU-4-6
Myc-Rev	GAAATAAGCTTTGTTCACACATG	Reparatur Myc-Tag
KurzLang41 723-6For	CCGAGCTCGGATCCATGTGTG	pMyc4-6short (um letztes β-Faltblatt verkürzt)
Kurz4-6Rev	CATCTAGAGAATTCTAGCCGCCGTCGTTGAAGTTG	
KurzLang41 723-6For	CCGAGCTCGGATCCATGTGTG	pMyc17-6short (um letztes β-Faltblatt verkürzt)
Kurz17-6Rev	CATCTAGAGAATTCTAGCCGCCGTCGTTGACGTGG	
KurzLang41 723-6For	CCGAGCTCGGATCCATGTGTG	pMyc23-6short (um letztes β-Faltblatt verkürzt)
Kurz23-6Rev	CATCTAGAGAATTCTAGCCGCCGTCGTTGGAAGTCG	
KurzLang41 723-6For	CCGAGCTCGGATCCATGTGTG	pMyc4-6long
Lang4-6Rev	GGAGATCTGACCGTGCATATGAAATTGAACCTTC	

Name des Oligonukleotids	Basensequenz des Oligonukleotids (5'→3')	Name des klonierten Konstrukts
KurzLang41 723-6For	CCGAGCTCGGATCCATGTGTG	pMyc17-6long
Lang17-6Rev	GGAGATCTGACCGTGCATTAACTTCAACATC	
KurzLang41 723-6For	CCGAGCTCGGATCCATGTGTG	pMyc23-6 long
Lang23-6Rev	GGAGATCTGACCGTGCATATCAATTGAAGTTC	
4NKFor	CAGATCTCCATGGATTATCAGAAAGAGATCGAGGGTAATGATAATAAGG	pMyc4-6NK
4NKRev	CCTTATTATCATTACCCTCGATCTCTTCTGATAATCCATGGAGATCTG	
4CKFor	CGACGGCGGCGAAGTTCAAAAGCATATGCACTAGGTCGAGTC	pMyc4-6NCK
4CKRev	GACTCGACCTAGTGCATATGCTTTGAACCTTCGCCGCCGTCG	
17NKFor	GATCTCCATGGATTATGAGAAAAAGTTCCACGGTGATGGTG	pMyc17-6NK
17NKRev	CACCATCACCGTGGAACTTTCTCATAATCCATGGAGATC	
17CKFor	CGACGGCGGCGATGTTGAAAAGAAAATGCACTAGCTCGAGTC	pMyc17-6NCK
17CKRev	GACTCGAGCTAGTGCATTTCAACATGCCGCCGTCG	
23NKFor	GATCTCCATGGATTATAACAAACAGTTCCACAATAATGGTAA TG	pMyc23-6NK
23NKRev	CATTACCATTATTGTGGAACTGTTGTTATAATCCATGGAGATC	
23CKFor	CGACGGCGGCGAACTTCAGAAAGGATATGCACTAGCTCGAGTC	pMyc23-6NCK
23CKRev	GACTCGAGCTAGTGCATATCCTTTGAAGTTGCCGCCGTCG	
4mit17Rev	ATTCTAGAGAATTCCCTAATGCATTTACCTCTACGTCACCGC CGTCGTTGTGCATATGAAATTGAACTTCGCC	4+17 Myc
4mit23Rev	ATTCTAGAGAATTCCCTAATGCATATGGAACTGTACTTCACCG CCGTCGTTGTGCATTTAACATCGCC	4+23 Myc
17mit4Rev	ATTCTAGAGAATTCCCTAATGCATATGGAACTGTACTTCACCG CCGTCGTTGTGCATTTAACATCGCC	17+4 Myc
17mit23Rev	ATTCTAGAGAATTCCCTAATGCATATCTATCTGTAGCTCACCG CCGTCGTTGTGCATTTAACATCGCC	17+23 Myc
Exp41723For	CAACATGTGTGAACAAAAGCTTATTTC	pExpMyc4
Exp4Rev	CAGAATTCCCTAGTGCATATGAAATTGAACTTC	
Exp41723For	CAACATGTGTGAACAAAAGCTTATTTC	pExpMyc17
Exp17Rev	CAGAATTCCCTAGTGCATTTAACATCAC	
Exp41723For	CAACATGTGTGAACAAAAGCTTATTTC	pExpMyc23
Exp23Rev	CAGAATTCCCTAGTGCATATCAATTGAAGTTTC	
GFP16Luc For	CAGCTAGCATGGTAAAGGAGAAGAACCTTCAC	Austausch von PES zu Ile-Ala-Val
GFP16Luc Rev	CAAAGCTTCTACAATTGGACTTCCGCCCTCTTG	
GFP16Luc For2	CAGCTAGCATGGTAAAGGAGAAGAACCTTCAC	pGFP-Luc
GFP16Luc Rev2	CAAAGCTTTACACGGCGATCTTCCGCCCTCTGGCCTTTA TGAGG	
Tetracystein eFor4	CTGGATCCATGTTCTGAATTGCTGTCCTGGCTGCTGCATGGA ACCTATGCAGATCTCCATGGATTATCAGCTC	pTCys-4-6
Tetracystein eRev4	GGTAGAGAATTCCCTAGTGCATATGAAATTGAACTTCGCC	

Name des Oligonukleotids	Basensequenz des Oligonukleotids (5'→3')	Name des klonierten Konstrukts
Tetracystein eFor17	CTGGATCCATGTTCTGAATTGCTGTCCCTGGCTGCTGCATGGA ACCTATGCAGATCTCCATGGATTATGAGATC	pTCys-17-6
Tetracystein eRev17	GGTAGAGAATTCCCTAGTGCATTTAACATCGCC	
Tetracystein eFor23	CTGGATCCATGTTCTGAATTGCTGTCCCTGGCTGCTGCATGGA ACCTATGCAGATCTCCATGGATTATAACATC	pTCys-23-6
Tetracystein eRev23	GGTAGAGAATTCCCTAGTGCATATCAATTGAAGTTGCC	
TAGzuTCG #4For	CAATTTCATATGCACTCGGTCGAGTCTAGAGGG	pMyc4-6-Stop-Ser
TAGzuTCG #4Rev	CCCTCTAGACTCGACCGAGTGCATATGAAATTG	
TAGzuTCG #17For	GAAGTTAAAATGCACTCGCTCGAGTCTAGAGGG	pMyc17-6-Stop-Ser
TAGzuTCG #17Rev	CCCTCTAGACTCGAGCGAGTGCATTTAACCTC	
TAGzuTCG #23For	CAAATTGATATGCACTCGCTCGAGTCTAGAGGG	pMyc23-6-Stop-Ser
TAGzuTCG #23Rev	CCCTCTAGACTCGAGCGAGTGCATATCAATTG	
4x2For	GGTCTAGATATCAGCTCGAGATCGAGGGTAATG	pMyc4-6 double
4x2Rev	GGTCTAGAGAATTCCCTAGTGCATATGAAATTGAACTTCGCC	
17x2For	GGTCTAGATATGAGATCAAGTCCACGGTGATG	pMyc17-6 double
17x2Rev	GGTCTAGAGAATTCCCTAGTGCATTTAACATCGCC	
23x2For	GGTCTAGATATAACATCCAGTTCCACAATAATG	pMyc23-6 double
23x2Rev	GGTCTAGAGAATTCCCTAGTGCATATCAATTGAAGTTGCC	
4PolyPFor	CTTCAGATCCGGCCCCCTCCCCGTGTCCACCGTC	pMyc4-6-PP
4PolyPRev	GACGTTGAAGTGGACACGGGGAGGCAGGGCGGGATCTGAA G	
17PolyPFor	CTTCAGATCCGGCCCCGCCTCCCCGTGTCCACGTCCACATC	pMyc17-6-PP
17PolyPRev	GATGTGGACGTGGACACGGGGAGGCAGGGCGGGATCTGAA G	
23PolyPFor	GAAATTGAGATCCGGCCCCGCCTCCCCGTGTCCACATCCAG CTC	pMyc23-6-PP
23PolyPRev	GAGCTGGATGTGGACACGGGGAGGCAGGGCGGGATCTCAA TTTC	
GFP-ActinFor	CAGAGCTAGCCGGCCGGACTCAGATCTCGATGTGCGACGA AGACGAGACCACCGCCCTC	pEGFP-alpha-Actin
GFP-ActinRev	GTGGTACCCCTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAAGG	
S824+23For	GTTAAGCTTGGTACCGAGCTGGATCC	pMyc-S824+23
S824+23Rev	GATCTAGAGAATTCCCTAGTGCATATCAATTGAAGTTGCC CCGTCGTTACGGTGGACGAGCTCTCCAAGTGGTGG	
Hsp110For	CAGCTAGCATGTCGGTGGTGGGGTTGGACG	pHsp110
Hsp110Rev	CACTCGAGCTAGTCCAAGTCCATATTAACAG	
n86For	CAGGATCCATGTGTGAACAAAAGCTTATTCTGAAGAAGACT TGGGTATGTATGGCAAGTTGAACGACCT	pMyc-h86
n86Rev	ATTCTAGAGAATTCCCTAACGGTGGACGAGCTCTCCAAG	
S824For	CAGGATCCATGTGTGAACAAAAGCTTATTCTGAAGAAGACT TGGGTATGTATGGCAAGTTGAACGACCT	pMyc-S824
S824Rev	ATTCTAGAGAATTCCCTAACGGTGGACGAGCTCTCCAAG	
S836For	CAGGATCCATGTGTGAACAAAAGCTTATTCTGAAGAAGACT TGGGTATGTATGGCAAGTTGAACGACCT	pMyc-S836
S836Rev	ATTCTAGAGAATTCCCTAACGGTGGACGAGCTCTCCAAG	

## 8.5 Anhang E: Antikörper

### Primärantikörper

Übersicht über die primären Antikörper, ihre genauen Klonbezeichnungen, Ursprungsorganismen, bindenden Epitopen, Firmennamen und Katalognummern.

Antikörper (Klon)	Epitop/Spezies Reaktivität	Spezies	Anbieter/Produktnummer
$\alpha$ -19S Regulator ATPase Subunit Rpt1 (S7)	MSS1, His6-konjugiert	Kaninchen/polyklonal	BioTrend/PW 8165
$\alpha$ -Aktin	C-terminales multiples Aktin-Peptid/ <i>Mammalia</i>	Kaninchen/polyclonal	Sigma/A 2066
$\alpha$ -Amyloid Oligomer (A11)	Amyloide Proteine, insb. A $\beta$ /Mensch, Hefe	Kaninchen/polyklonal	Hergestellt und z. Verfügung gestellt Prof. Dr. C. Glabe
$\alpha$ -Amyloid Oligomer (A11)	Amyloide Proteine, insb. A $\beta$ /Mensch/Hefe	Kaninchen/polyklonal	Chemicon/AB9234
$\alpha$ -Calnexin	Peptidfragment/Mensch	Maus/monoklonal	MPI für Biochemie/Abt. Zellbiologie
$\alpha$ -COPII	Peptidfragment/ <i>Mammalia</i>	Ziege/polyklonal	MPI für Biochemie/Abt. Zellbiologie
$\alpha$ -eIF4GII (R16S)	Mensch	Maus/monoklonal	Santa Cruz/sc-100732
$\alpha$ -GAPDH (6C5)	GAPDH vom Kaninchen-Muskel/ <i>Mammalia, Aves, Pisces</i>	Maus/monoklonal	Chemicon/MAB374
$\alpha$ -GFP (7.1 und 13.1)	GFP aus <i>Aequorea victoria/Aequorea victoria</i>	Maus/monoklonal	Roche/11814460001
$\alpha$ -GM130	Peptidfragment GM130/ <i>Mammalia</i>	Schaf/polyklonal	MPI für Biochemie/Abt. Zellbiologie
$\alpha$ -HA (16B12)	Synthetisches Peptid des Humanen HA/Mensch	Maus/monoklonal	Covance/MMS-101P
$\alpha$ -HA Fluorescein-konjugiert (BMG-3F10)	Synthetisches Peptid des Humanen HA/Mensch	Maus/monoklonal	Roche/1988506
$\alpha$ -HA Fluorescein konjugiert (12CA5)	Synthetisches Peptid des humanen HA/Mensch	Maus/monoklonal	Roche/1666878
$\alpha$ -Hsp27 (G3.1)	Natives humanes Hsp27/Mensch, Affe	Maus/monoklonal	Stressgen/SPA-800
$\alpha$ -Hsp70 (C92F3A-5)	Aus Zellkultur gereinigtes humanes Hsp70/ <i>Mammalia, Pisces, Saccharomyces</i>	Maus/monoklonal	Stressgen/SPA810
$\alpha$ -Hsp90 $\alpha$ (N17)	N-Terminus humanes Hsp90 $\alpha$ /Mensch	Ziege/polyklonal	Santa Cruz/Sc-1055
$\alpha$ -Hsp90 $\alpha$ (AC88)	<i>Achlya ambisexualis</i> Hsp90	Maus, monoklonal	Abcam/ab13492
$\alpha$ -Hsp110 (21)	Hamster Hsp110, As 703 – 858/Mensch, Maus, Ratte, Hund	Maus/monoklonal	BD/610510
$\alpha$ -Hsp110 (N-187)	Mensch, Maus, Ratte,	Maus/monoklonal	Santa Cruz/sc-74550
$\alpha$ -c-Myc (9E10)	Synthetisches Peptid des humanen c-Myc/Mensch	Maus/ monoklonal	Santa Cruz/Sc-40
$\alpha$ -c-Myc Cy3	Synthetisches Peptid des	Maus, monoklonal	Sigma/C 6594

Antikörper (Klon)	Epitop/Spezies Reaktivität	Spezies	Anbieter/Produktnummer
konjugiert (9E10)	humanen c-Myc/Mensch		
$\alpha$ -c-Myc-FITC (9E10)	Synthetisches Peptid des humanen c-Myc/Mensch	Maus/monoklonal	Zymed/13-2511
$\alpha$ -Polyglutamin (5TF1-1C2- 17.2)	N-terminale Sequenz des TBP/Mensch	Maus/monoklonal	Chemicon/MAB1574
$\alpha$ -Ubiquitin (P4D1)	Humanes Ubiquitin/ <i>Mammalia</i>	Maus/monoklonal	Santa Cruz/sc-8017
$\alpha$ -VDAC1 (20B12)	humane VDAC1	Maus/monoklonal	Santa Cruz/sc-58649

### ***Sekundärantikörper***

**Übersicht über die sekundären Antikörper, Ursprungsorganismen, bindenden Epitopen, Firmennamen und Katalognummern.**

Antikörper	Epitop/Spezies Reaktivität	Spezies	Anbieter/Produktnummer
$\alpha$ -Kaninchen IgG Peroxidase konjugiert	IgG des Kaninchen/Kaninchen	Ziege/polyklonal	Sigma/A9169
$\alpha$ -Maus IgG Peroxidase konjugiert	IgG der Maus/Maus	Ziege/polyklonal	Sigma/A4416
$\alpha$ -Ratte IgG Peroxidase konjugiert	IgG der Ratte/Ratte	Kaninchen/polyklonal	Sigma/A 5795
$\alpha$ -Ziege IgG Peroxidase konjugiert	IgG der Ziege/Ziege	Kaninchen/polyklonal	Sigma/A3540
$\alpha$ -Ziege IgG Alexa488 konjugiert	IgG der Ziege/Ziege	Kaninchen/polyklonal	MPI für Biochemie/Abt. Zellbiologie
$\alpha$ -Maus IgG Alexa488 konjugiert	IgG der Maus/Maus	Ziege/polyklonal	MPI für Biochemie/Abt. Zellbiologie

## 8.6 Anhang F: Übersicht über die Aminosäuresequenzen der *de novo* Proteine und ihrer modifizierten Konstrukte

Sequenzen der *de novo* Proteine und ihrer modifizierten Versionen. Dargestellt sind alle modifizierten Konstrukte, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Der Myc-Tag ist grün unterlegt, der C4-Tag violett. Hydrophile Aminosäuren der β-Faltblatt Proteine oder α-helikalen Proteine sind blau unterlegt, hydrophobe Aminosäuren sind auf gelbem Grund dargestellt. Das Startmethionin der originalen Sequenz ohne Myc-tag und flankierenden Reste ist dunkelrot unterlegt, um die Länge der Originalsequenz zu verdeutlichen. Substitutionen mit Lysin (K) oder Prolin (P) sind rot bzw. türkis hervorgehoben.

```

B4: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGEVNDIQRGPGRVHFENVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B17: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSSGKVDFHVNNDGGPVEVKMH
B23: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFQIQLNDGHGHIKVDFNDGGELQIDMH
B4NK: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGEVNDIQRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B17NK: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFQIQLNDGHGHIKVDFNDGGELQIDMH
B23NK: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFQIQLNDGHGHIKVDFNDGGELQIDMH
B4NC: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B17NC: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVEVKMH
B23NC: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFQIQLNDGHGHIKVDFNDGGELQIDMH
B4P: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGEVNDIQRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B17P: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSSGKVDFHVNNDGGPVEVKMH
B23P: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B4ΔF: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGELQIDMH
B17ΔF: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSSGKVDFHVNNDGGELQIDMH
B23ΔF: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFQIQLNDGHGHIKVDFNDGGELQIDMH
B4+17F: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGEVNDIQRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B4+23F: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGEVNDIQRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B17+4F: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSSGKVDFHVNNDGGPVEVKMH
B23+17F: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSSGKVDFHVNNDGGPVEVKMH
B4doppel: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGEVNDIQRGPGRVHFVHSSGSNDEVNFNDGGPVCFCMH
B17doppel: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSSGKVDFHVNNDGGPVEVKMH
B23doppel: MCEQKLISBEDLGMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFQIQLNDGHGHIKVDFNDGGELQIDMH
C4β4: MGFLNCCPGCCMEPMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSGSNLEVNFNDGGEVFCMH
C4β17: MGFLNCCPGCCMEPMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSGSNLEVNFNDGGEVFCMH
C4β23: MGFLNCCPGCCMEPMQISMVYQLEIEGNDNKVBQLNDSGGDLCIQIRGPGRVHFVHSSSGKVDFHVNNDGGEVFCMH
αS824: MCEQKLISBEDLGMGKNDLLEDLQEVIKNLHKNWHGGKDNDHDVNHLLQNVIEDIHDFFMGGGSGKLQEMMKFQQVLDEINNLQ
αS836: MCEQKLISBEDLGMGKNDLLEDLQEVIKHVNQHWWGGQKNNKVDHHLQNVIEDIHDFFMGGGSGKLQEMMKFQQVLDEIKQO
αn86: MCEQKLISBEDLGMGKNDLLEDLQEVIKLGPDSGHQNVIDEDIHDFFMGGGSGKLQEMMKFQQVLDEHHLEELVBR
αS824+β23F: MCEQKLISBEDLGMGKNDLLEDLQEVIKLGPDSGHQNVIDEDIHDFFMGGGSGKLQEMMKFQQVLDEINNLQ

```

## 8.7 Anhang G: Interaktorenlisten der *de novo* Proteine

Liste der mit β23 interagierenden Proteine im Vergleich zu den Kontrollen αS824 und pcDNA3 geordnet nach Funktionen und Vorkommen in der Zelle.

Genname	Proteinname	MW
<b>Translation- und Ribosomen-assoziiert</b>		
EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	50,1
EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	166,6
EIF3C	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	105,5
EIF3D	Uncharacterized protein EIF3D	63,9
EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	52,2
EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	39,1
EIF3G	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	35,6
EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	36,5
EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L	70,9
EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	46,2
EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	46,9
EIF4G3	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	176,7

<b>Genname</b>	<b>Proteinname</b>	<b>MW</b>
IGF2BP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	63,7
WDR3	WD repeat-containing protein 3	106,1
SBDS	Ribosome maturation protein SBDS	28,8
RPS27A	40S ribosomal protein S27a	18,0
PDCD11	Protein RRP5 homolog	208,7
DIMT1L	Probable dimethyladenosine transferase	35,2
EPRS	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	170,7
AIMP2	aa-tRNA synthetase complex-interacting multif. protein	35,3
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	53,2
YARS	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59,1
<b>Transkription</b>		
BTF3	Transcription factor BTF3	22,2
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	136,4
CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	220,8
CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	266,9
GTF2I	General transcription factor II-I	112,4
PNN	Pinin	81,6
PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha	34,9
SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	102,0
<b>Chaperone</b>		
BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2	23,8
CHORDC1	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	37,5
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	70,9
HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	92,1
NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	94,7
DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1	44,9
DNAJB1	DnaJ homolog subfamily B member 1	38,0
<b>Zytoskelett</b>		
AKAP12	A-kinase anchor protein 12	191,5
CCDC88A	Girdin	216,0
DIAPH1	Protein diaphanous homolog 1	141,4
FLNA	Filamin-A	280,7
FLNB	Filamin B	281,6
FLNC	Filamin C	291,0
KIF5B	Kinesin-1 heavy chain	109,7
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	31,6
PLEC1	Plectin-1	531,8
TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	50,1
TUBB2C	Tubulin beta-2C chain	49,8
VIM	Vimentin	53,7
ZYX	Zyxin	67,3
<b>Proteindegradation</b>		
CACYBP	Calcyclin-binding protein	26,2
ERLIN2	Erlin-2	37,8
SUMO2	Small ubiquitin-related modifier 2	10,9
UBR4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	576,0
<b>mRNS-Prozessierung</b>		
BAT1	Spliceosome RNA helicase BAT1	50,7
DDX18	ATP-dependent RNA helicase DDX18	75,4
GEMIN4	Gem-associated protein 4	120,5
GEMIN5	Gem-associated protein 5	168,6
RBM8A	RNA-binding protein 8A	19,9
SMN1	Survival motor neuron protein	31,8
SR140	U2-associated protein SR140	118,3
STRAP	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	39,8
THOC2	THO complex subunit 2	182,8

Genname	Proteinname	MW
<b>DNS-Modellierung</b>		
PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	469,1
H1F0	Histone H1.0	20,9
RBBP4	Histone-binding protein RBBP4	47,7
RUVBL1	RuvB-like 1	50,2
RUVBL2	RuvB-like 2	51,2
SMARCA4	SMARCA4	188,2
SMARCA5	SMARCA5	121,9
SMARCC1	SMARCC1	122,9
PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1	42,5
SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein 4	147,2
<b>Nukleus</b>		
KPNA2	Importin subunit alpha-2	57,9
LMNB1	Lamin-B1	66,4
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	236,5
RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein	28,8
NVL	Nuclear valosin-containing protein-like	95,1
<b>Vesikulärer Transport</b>		
AP1B1	AP-1 complex subunit beta-1	104,6
AP1G1	AP-1 complex subunit gamma-1	94,1
AP1M1	AP-1 complex subunit mu-1	49,8
CLTC	Clathrin heavy chain 1	191,6
SEC16A	Protein transport protein Sec16A	251,9
VAPA	VAPA	32,6
<b>Mitochondrien</b>		
SLC25A6	ADP/ATP translocase 3	32,9
CHCHD3	CC-helix-cc-helix domain-containing protein 3	26,2
IMMT	Mitochondrial inner membrane protein	83,7
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	30,8
VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	31,6
VDAC3	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	30,8
SSBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	17,3
<b>ER</b>		
CHERP	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	103,6
<b>Metabolismus allgemein</b>		
CAD	CAD protein	243,0
HDLBP	Vigilin	141,5
ALDH18A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	87,3
<b>Andere</b>		
AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	629,1
BAT2D1	BAT2 domain-containing protein 1	317,2
HCFC1	Host cell factor 1	213,5
PCNP	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	18,9
TNKS1BP1	Tankyrase 1 binding protein 1	181,8
SEPT2	Septin-2	45,5
SEPT7	Septin-7	50,8
SEPT9	Septin-9	65,4

**Übersicht über spezifische  $\alpha$ S824-Interaktoren.**

Genname	Proteinname	MW
RPS28	40S ribosomal protein S28	10,3
RPL35	60S ribosomal protein L35	14,6
CGI-59	Putative uncharacterized protein CGI-59	9,4
LARP1	La-related protein 1	123,5
LUC7L2	<b>Putative RNA-binding protein Luc7-like 2</b>	54,2
PABPC4	PABPC4 protein	72,4

**Übersicht über Interaktoren, welche spezifisch bei  $\beta$ 4,  $\beta$ 17 oder  $\beta$ 23 nach Co-IP angereichert wurden.**

<b>Genname</b>	<b>Proteinname</b>
<b>Spezifische <math>\beta</math>4-Interaktoren</b>	
COIL	Ceilin
EIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6
FAM98A	Protein FAM98A
GRWD1	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1
HIST1H1E	Histone H1.4
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein
JUP	Junction plakoglobin
PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1
PPAN	Suppressor of SWI4 1 homolog
PRR6	Proline-rich protein 6
RPL39	60S ribosomal protein L39
RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1
SR140	U2-associated protein SR140
TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain
TUFM	Elongation factor Tu, mitochondrial
<b>Spezifische <math>\beta</math>17-Interaktoren</b>	
AP1B1	AP-1 complex subunit beta-1
AP1G1	AP-1 complex subunit gamma-1
CACYBP	Calcyclin-binding protein
CAD	CAD protein
CHORDC1	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1
COIL	Ceilin
EEF1G	Elongation factor 1-gamma
EIF3D	Uncharacterized protein EIF3D
EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III
EIF4G3	Eukaryotic initiation factor 4 gamma 3
EPRS	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase
HCFC1	Uncharacterized protein HCFC1
HDLBP	Vigilin
IGF2BP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3
KIAA1967	Protein KIAA1967
KPNA2	Importin subunit alpha-2
RBBP4	Histone-binding protein RBBP4
RBM34	RNA-binding protein 34
RUVBL1	RuvB-like 1
SAFB	Scaffold attachment factor B
SEPT2	Septin-2
SEPT9	Septin-9
SLC25A5	ADP/ATP translocase 2
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes protein 1A
SUB1	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15
TXN	Thioredoxin
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
VDAC3	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3
<b>Spezifische <math>\beta</math>23-Interaktoren</b>	
ALDH18A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
AP1B1	AP-1 complex subunit beta-1
CACYBP	Calcyclin-binding protein
CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4
CHERP	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein
DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1
EIF3D	Uncharacterized protein EIF3D
EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III

Genname	Proteinname
EIF4G3	Eukaryotic initiation factor 4 gamma 3
GTF2I	General transcription factor II-I
H1F0	Histone H1.0
HCFC1	Uncharacterized protein HCFC1
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein
HSPH1	Heat shock protein 105 kDa
LMNB1	Lamin-B1
NVL	Nuclear valosin-containing protein-like
RBBP4	Histone-binding protein RBBP4
RBM8A	RNA-binding protein 8A
RUVBL1	RuvB-like 1
RUVBL2	RuvB-like 2
SEPT9	Septin-9
SMARCA4	SMARCA4
SR140	U2-associated protein SR140
TUBB2C	Tubulin beta-2C chain
UBR4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
VIM	Vimentin
WDR3	WD repeat-containing protein 3

## 9. Veröffentlichungen

### 9.1 Publikationen

**Heidi Olzscha**<sup>1</sup>, Sonya M. Schermann<sup>1</sup>, Andreas C. Woerner, Stefan Pinkert, Michael H. Hecht, Gian G. Tartaglia, Michele Vendruscolo, Manajit Hayer-Hartl, F. Ulrich Hartl, and R. Martin Vabulas. Amyloid-like Aggregates Sequester Numerous Metastable Proteins with Essential Cellular Functions. Das Manuskript wurde von der Zeitschrift *Cell* am 25.10.2010 zur Publikation akzeptiert.

<sup>1</sup> Diese Autoren trugen gleichwertig zur Publikation bei.

### 9.2 Posterbeiträge

**Heidi Olzscha**, Andreas C. Woerner, Michael H. Hecht, R. Martin Vabulas, F.-Ulrich Hartl. Cytotoxicity of *de novo* amyloid-like proteins in eukaryotic and prokaryotic cells. EMBO Conference Series „Cellular protein homeostasis in disease and ageing“. Dubrovnik (Croatia), May 2009.

**Heidi Olzscha**, Andreas C. Woerner, Michael H. Hecht, R. Martin Vabulas, F.-Ulrich Hartl. Cytotoxicity of *de novo* amyloid-like proteins. FASEB Summer Research Conference „Protein folding in the Cell“. Saxtons River (USA), July 2008.

**Heidi Olzscha**, R. Martin Vabulas, Michael H. Hecht, F.-Ulrich Hartl. Cytotoxicity of *de novo* amyloid proteins in mammalian cells. Gordon Conference „Stress Proteins in Growth, Development and Disease“. Oxford (Great Britain), August 2007.

## **10. Lebenslauf**