Zusammenfassung Dissertation Simon Pöpsel

“Proteolysis and ATP-independent Disaggregation of Tau Aggregates by the Human Serine Protease HTRA1”

Deutsch

Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle gewährleisten die korrekte Faltung, Lokalisation und Mengen der zellulären Proteine und sichern dadurch die Intaktheit des Proteoms. Wenn dies nicht in ausreichendem Maß gelingt, kann es zur vermehrten Fehlfaltung von Proteinen kommen, was den Verlust ihrer normalen Funktionsweise und die Ansammlung unlöslicher Aggregate zu Folge haben kann. Enzyme der Proteinqualitätskontrolle katalysieren die Faltung von neu synthetisierten und Rückfaltung beschädigter Proteine, den proteolytischen Abbau alter, geschädigter oder fehlgefalteter Proteine, oder das Auflösen von Aggregaten mit folgender Rückfaltung oder Proteolyse. Insbesondere der letztere Prozess, die Disaggregation, stellt besondere Anforderungen an die beteiligten Enzyme, da Proteinaggregate sehr stabile Komplexe sind, deren Auflösung und Proteolyse nach bisherigem Wissensstand den Einsatz chemischer Energie aus der Hydrolyse von ATP erfordert.

HtrA Proteasen sind in ATP unabhängige, hochkonservierte Serinproteasen, deren Rolle für die Proteinqualitätskontrolle in vielen Spezies nachgewiesen und detailliert untersucht werden konnte. Die humanen HtrAs erfüllen offenbar vielfältige Funktionen, da sie mit vielen grundlegenden zellulären Prozessen assoziiert sind, z.B. mit Zellmigration, Wachstum und Apoptose. Eine Assoziation von HTRA1 mit Proteinablagerungen in der Alzheimerschen Krankheit (AD), sowie die durch HTRA1 katalysierte Proteolyse des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, das in AD Aggregate ausbildet, ließen eine Rolle von HTRA1 in der Proteinqualitätskontrolle humaner Zellen vermuten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den biochemischen Mechanismus des Abbaus von Tau, insbesondere von amyloiden Tau Aggregaten durch HTRA1 zu charakterisieren, da die Proteolyse von Tau Aggregaten eine Möglichkeit darstellt, wie neuronale Zellen sich vor schädlichen Effekten dieser Ablagerungen schützen könnten.

Es konnte hier gezeigt werden, dass neben löslichem Tau auch verschiedene Formen von Tau Aggregaten durch rekombinantes HTRA1 proteolytisch abgebaut werden konnten. Dies galt auch für solche Aggregate, die spektroskopischen und rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen zufolge den fibrillären, mit neurodegenerativen Prozessen assoziierten Tau-Aggregaten entsprachen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass HTRA1 eine Disaggregaseaktivität aufweist, die das Auflösen von stabilen Tau Aggregaten ermöglicht und damit dazu beiträgt, dass auch aggregiertes Tau durch HTRA1 proteolysiert werden kann. Mithilfe von Ultrazentrifugation und Rasterkraftmikroskopie konnte schließlich gezeigt werden, dass eine proteolytisch inaktive HTRA1-Mutante Tau Fibrillen auflösen konnte. Diese Disaggregation ermöglichte außerdem einen erleichterten proteolytischen Abbau von Tau Aggregaten nach anschließender Zugabe von proteolytisch aktivem HTRA1. Die massenspektrometrische Analyse der proteolytischen Spaltprodukte verdeutlichte, dass durch die Disaggregation insbesondere diejenigen Bereiche des Tau Proteins vermehrt hydrolysiert wurden, die sich in dem schwer zugänglichen Kern befanden. Somit konnte ein Modell vorgeschlagen werden, demzufolge HTRA1 eine ATP unabhängige Disaggregaseaktivität besitzt, die es der Protease ermöglicht, nach Auflösung der festen Struktur des Kerns der Aggregate auch zu den Bereichen Zugriff zu bekommen, die vermutlich zu der Persistenz von amyloiden Aggregaten unter pathologischen Bedingungen beitragen. Experimente mit HTRA1 Mutanten, deren PDZ Domäne mutiert oder deletiert war, lassen eine Rolle der PDZ Domäne im Prozess der Disaggregation vermuten. Allerdings ist der genaue Mechanismus und das Ausmaß der Beteiligung der PDZ Domäne noch unklar, da auch ohne diesen Teil des Enzyms eine Disaggregation möglich war, wenn auch mit weniger deutlichem Effekt auf die anschließende Proteolyse durch aktives HTRA1.

In Zellkulturexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass rekombinantes HTRA1 von kultivierten humanen Zellen aufgenommen wurde und im Zytoplasma mit seinem Substrat

Tau kolokalisierte. Dies zeigt zum Einen einen möglichen Weg auf, mit Hilfe dessen das sezernierte HTRA1 Protein auch intrazellulär zur Verfügung gestellt werden könnte. Zum Anderen eröffnete dieses Phänomen die Möglichkeit, in einem experimentellen Modell der intrazellulären Tau Aggregation die Mengen an zytoplasmatischem HTRA1 zu manipulieren. Diese Vorgehensweise wurde genutzt um zu zeigen, dass HTRA1 nicht nur *in vitro*, sondern auch in humanen Zellen Tau Aggregate disaggregieren und proteolysieren konnte, da erhöhte Mengen an intrazellulärem, proteolytisch inaktivem, sowie auch aktivem HTRA1 zu einer Verminderung der Menge an Tau Aggregaten führten.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass anhand der hier dargelegten experimentellen Daten ein Mechanismus der Proteinqualitätskontrolle für HTRA1 nachgewiesen wurde, der nicht nur das bis hierher bekannte Repertoire der HtrA Proteasen erweitert, sondern auch einen neuartigen Mechanismus der ATP-unabhängigen Disaggregation zeigt. HTRA1 vereinigt also Protease- und Disaggregasefunktionen in einem Enzym und kann folglich als ein neuer Faktor der Proteinqualitätskontrolle betrachtet werden, der ein interessantes Ziel pharmazeutischer Intervention in neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise AD darstellen könnte.

<u>English</u>

Loss of normal protein function and the accumulation of aberrantly folded proteins as insoluble aggregates are potential manifestations of the impaired integrity of the cellular proteome. To maintain proteins intact and, consequently, prevent misfolding and aggregation, mechanisms of protein quality control have evolved. Protein quality control factors catalyze the folding of proteins, their transport and assembly into complexes as well as the degradation of damaged or aged proteins, thereby conferring physiological protein abundance, localization and function. Although some protein aggregates such as amyloids are generally considered to resist proteolytic degradation, disaggregases have recently gained attention, which use chemical energy from the hydrolysis of ATP to disrupt aggregates and help to restore or degrade the constituent proteins. Fatal disorders such as Alzheimer's or Parkinson's disease are characterized by the continuous deposition of aggregates, which underlines the importance of learning about the pathways and mechanisms of protein quality control.

HTRA1 is a human member of the conserved family of HtrA serine proteases, many of which are well known players of protein quality control in diverse organisms such as bacteria and plants. Whereas HTRA1 was previously shown to degrade the microtubule-associated protein Tau which forms characteristic amyloid aggregates in so-called Tauopathies, of which Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent, the biochemical and cellular implications of these observations remained unclear. Therefore, the aim of this work was to characterize the mechanistic basis of the degradation of Tau by HTRA1 and in particular of Tau aggregates resembling those found in AD.

In vitro proteolysis experiments using recombinant human Tau and HTRA1 showed that HTRA1 was able to proteolyze not only soluble, but also aggregated Tau which was rich in β-sheets characteristic of amyloids. Heparin-induced Tau aggregates resembling amyloid aggregates biochemically and morphologically were also efficiently degraded by HTRA1. This lead to the hypothesis of a potential disaggregase activity which would allow HTRA1 to resolve tightly packed Tau aggregates and render their component monomers susceptible to the proteolytic attack by HTRA1. On the basis of sedimentation experiments and atomic force microscopic studies, it was shown that proteolytically inactive HTRA1 was able to solubilize Tau fibrils. Disaggregation by the inactive HTRA1 S328A mutant facilitated subsequent proteolysis by wt HTRA1 and thus suggested a combined disaggregase and protease function of HTRA1 that involves the loosening of the aggregate core structure. The hydrolysis of regions of Tau residing in the fibril core was detected on the basis of mass-spectrometric analysis of peptidic products generated by the proteolysis of fibrils after previous disaggregation. Experiments using mutant variants of HTRA1 pointed at a possible

role of the PDZ domain of HTRA1, which was, however, not strictly required for disaggregation. The data presented here thus allowed a preliminary model of disaggregation, in which the sequential binding of stretches of the Tau protein in fibrils and the eventual loosening of the aggregate core facilitates the proteolysis tightly packed part of the aggregate.

Cultured human cells spontaneously internalized recombinant HTRA1 from the extracellular space, which on one hand pointed at a possible way of generating a cytoplasmic pool HTRA1, which is normally secreted. On the other hand, this observation allowed for the experimental manipulation of intracellular levels of HTRA1 in a cellular model of cytoplasmic Tau aggregation. Both active and inactive HTRA1 introduced into the cytoplasm of cultured HEK-293T cells led to a reduction of the intracellular aggregate burden, indicating that HTRA1 performs its disaggregase function in the cellular context.

Taken together, these findings suggest a combination of disaggregase and protease activities by HTRA1, which not only expands the known repertoire of protein quality control functions by HtrAs, but also represent a novel mechanism of ATP-independent disaggregation. The model presented here will form the basis of future studies aimed at elucidating the mechanism of disaggregation in further detail.