

**Spektroskopische Untersuchungen des
Einflusses von Druck, Cosolventien und
Modellbiomembranen auf das
Aggregationsverhalten von Insulin**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht beim
Fachbereich Chemie
der Universität Dortmund

von
Stefan Grudzielanek
aus Lünen

Dortmund, 2007

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Rehage

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2007

Danke!

Mein besonderer Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. R. Winter, der durch seine Themenstellung diese interessante und vielfältige Arbeit erst ermöglichte. Zudem möchte ich an dieser Stelle seine ständige hilfreiche Diskussionsbereitschaft würdigen.

Herrn Prof. Dr. H. Rehage danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Wojciech Dzwolak möchte ich für die kreativen, zwar oft unüblichen, aber immer konstruktiven Gedankenanstöße im Zusammenhang mit fachlichen Diskussionen auf dem Gebiet der Proteinaggregation danken.

Lally Mitra danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Aufnahme der DSC-Thermogramme.

Herrn Dr. Claus Czeslik danke ich für die umfangreiche Betreuung und die stetige Diskussionsbereitschaft zu nahezu allen Gebieten der Physikalischen Chemie, vor allem zum Themenkomplex der Fluoreszenzspektroskopie. Ohne seine fachliche und technische Unterstützung hätte so manche Messreihe gar nicht erst durchgeführt werden können. Allen weiteren wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern des Arbeitskreises Physikalische Chemie I möchte ich für die Schaffung eines stets freundlichen Arbeitsklimas danken. Insbesondere gilt jedoch mein Dank meinen langjährigen Bürogenossen Dr. Ralf Jansen für die kooperative, stets unverkrampfte Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Insulinaggregation und Dr. Nikolai Smolin für seine – allerdings nur teilweise fruchtbaren – Versuche, mir die russische Sprache beizubringen.

Mein ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Verlobten, meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem Weg begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	IV
1 Einleitung	1
2 Theoretischer Hintergrund	5
2.1 Proteinfaltung, -fehlfaltung und -aggregation	5
2.2 Druck- und Temperatureffekte auf Proteinfaltung und -aggregation	10
2.3 Cosolvenseffekte auf Proteinfaltung und -aggregation	14
2.4 Einfluss von Lipidmembranen auf das Aggregationsverhalten von Proteinen.....	17
2.5 Insulin	23
3 Methodischer Teil	27
3.1 Fluoreszenzspektroskopie	27
3.1.1 Elektronische Anregung und Relaxation	27
3.1.2 Fluoreszenzcharakteristika.....	29
3.1.2.1 Spektren	29
3.1.2.2 Fluoreszenzdepolarisation.....	31
3.1.3 Verwendete Fluorophore	33
3.2 Circular dichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie).....	35
3.2.1 Grundlagen.....	35
3.2.2 CD-Spektroskopie zur Untersuchung von Proteinen.....	37
3.3 Absorptionsspektroskopie.....	38
3.3.1 Grundlagen.....	38
3.3.2 1-Anilino-8-naphthalinsulfonsäure (ANS)	39
3.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)	40
4 Experimenteller Teil	42

4.1	Probenpräparation	42
4.1.1	Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.....	42
4.1.2	Präparation von Insulinlösungen ohne extrinsische Fluorophore	43
4.1.3	Markierung von Insulin mit Alexa 488	43
4.1.4	Präparation von Insulinproben für den ThT-Assay	45
4.1.5	Präparation von Insulinproben für die ANS-Titration	46
4.1.6	Präparation unilamellarer Vesikel	47
4.2	Fluoreszenzspektroskopie	47
4.2.1	Instrumentelles	47
4.2.2	Durchführung und Auswertung der Messungen	51
4.2.2.1	<i>ThT-Assay</i>	51
4.2.2.2	<i>Untersuchungen mit Alexa 488 markiertem Insulin</i>	55
4.2.2.2.1	Messungen der statischen Anisotropie	55
4.2.2.2.2	Zeitaufgelöste Messungen.....	58
4.3	CD-Spektroskopie	61
4.3.1	Durchführung und Auswertung der Messreihen	61
4.4	UV-Spektroskopie im Rahmen der ANS-Titration	62
4.4.1	Durchführung und Auswertung der Messreihen	62
4.5	DSC-Untersuchungen	63
4.5.1	Durchführung und Auswertung der Messungen	63
5	Ergebnisse und Diskussion	65
5.1	Einfluss von Cosolventien auf das Aggregationsverhalten von Insulin ...	65
5.1.1	Cosolvenseffekte im prä-aggregierten Zustand des Proteins	65
5.1.1.1	<i>Rotationsdynamik des Proteins</i>	65
5.1.1.2	<i>Tertiärstruktur des Proteins</i>	68
5.1.1.3	<i>Sekundärstruktur des Proteins</i>	70
5.1.2	Einfluss von Cosolventien auf die Aggregationskinetik	74
5.1.2.1	<i>Rotationsdynamik des Proteins</i>	74
5.1.2.2	<i>Aggregationskinetik des Proteins: ThT-Assay</i>	78
5.1.2.3	<i>Sekundärstruktur des Proteins</i>	81

5.1.3	Einfluss von Cosolventien auf die Oberflächeneigenschaften vollständig ausgebildeter Insulinaggregate.....	87
5.1.4	Diskussion der Wirkmechanismen verschiedener Cosolvenszusätze im Kontext der Aggregation von Insulin	89
5.2	Einfluss von Druck auf das Aggregationsverhalten von Insulin	92
5.2.1	Druckeffekte im prä-aggregierten Zustand des Proteins	92
5.2.1.1	<i>Rotationsdynamik des Proteins.....</i>	<i>92</i>
5.2.2	Einfluss von Druck auf die Aggregationskinetik von Insulin.....	95
5.2.2.1	<i>Entwicklung eines neuen mechanistischen Szenarios aus der druck- und lösungsmittelabhängigen Aggregationskinetik des Proteins.....</i>	<i>95</i>
5.2.2.2	<i>Charakterisierung von „off pathway“-Aggregaten in rein wässriger Lösung.....</i>	<i>101</i>
5.2.3	Druckstabilität verschiedener Aggregatformen von Insulin.....	103
5.2.3.1	<i>Qualitative Untersuchung des Druckverhaltens aggregierter Insulinspezies</i>	<i>103</i>
5.2.3.2	<i>Quantitative Untersuchung der Dissoziationskinetik von „off-pathway“-Aggregaten unter Druck</i>	<i>108</i>
5.3	Einfluss von Modellbiomembranen auf das Aggregationsverhalten von Insulin	111
5.3.1	Ergebnisse des ThT-Assays	112
5.3.2	Diskussion der Ergebnisse	119
6	Zusammenfassung.....	126
7	Anhang	133
8	Literatur	140

Publikationsliste

- Jansen, R., Grudzielanek, S., Dzwolak, W. & Winter, R. (2004). High Pressure Promotes Circularly-shaped Insulin Amyloid. *J. Mol. Biol.* **338**, 203-206.
- Dzwolak, W., Grudzielanek, S., Smirnovas, V., Ravindra, R., Nicolini, C., Jansen, R., Lokszejn, A., Porowski, S. & Winter, R. (2005). Ethanol-Perturbed Amyloidogenic Self-Assembly of Insulin: Looking for Origins of Amyloid Strains. *Biochemistry*, **44**, 8948-8958.
- Grudzielanek, S., Jansen, R. & Winter, R. (2005). Solvational Tuning of the Unfolding, Aggregation and Amyloidogenesis of Insulin. *J. Mol. Biol.* **351**, 879-894.
- Angelovski, G., Keränen, M. D., Köhling, P., Grudzielanek, S. & Eilbracht, P. (2006). A Rapid and Reliable Assay for Regioselectivity Using Fluorescence Spectroscopy. *Adv. Synth. Cat.* **348**, 1193-1199.
- Grudzielanek, S., Smirnovas, V. & Winter, R. (2006). Solvation-assisted Pressure Tuning of Insulin Fibrillation: From Novel Aggregation Pathways to Biotechnological Applications. *J. Mol. Biol.* **356**, 497-509.

1 Einleitung

Proteine bilden neben Kohlehydraten und Nukleinsäuren eine der drei großen Klassen von organischen Makromolekülen, die fundamentale Bestandteile jedes Lebewesens ausmachen. Ihre Bedeutung spiegelt sich vor allem in zwei Tatsachen wider: Zum einen stellen sie mit teilweise mehr als 20% des Feuchtgewichtes den quantitativ bedeutendsten Anteil an organischen Makromolekülen in Zellen, Geweben und Organen [Löffler 1998]. Zum anderen zeichnen sie sich durch eine außerordentlich vielfältige Funktionalität aus, wie z. B. der katalytischen Beteiligung an biochemischen Prozessen, der Signaltransduktion, der Zellmotilität oder der Regulierung der Proteinexpression.

Zur Aufrechterhaltung ihrer biologischen Aktivität ist die Faltung von Proteinen, die *in vivo* durch eine Reihe zellulärer Kontrollmechanismen geregelt wird, in ihre jeweilige native Konformation, zwingend erforderlich [Löffler 1998]. Unter destabilisierenden Bedingungen, z. B. durch Mutationen einzelner Aminosäuren, kann die unkontrollierte Faltung von Proteinen in alternative, nicht-native Konformationen verheerende pathogene Folgen haben, denn in vielen Fällen kann eine Protein-Fehlfaltung und eine damit einher gehende Aggregation zum Verlust der biologischen Aktivität des Proteins führen. Zur Zeit sind etwa 20 verschiedene, sequentiell nicht verwandte Proteine bekannt, deren Aggregation in Form von Amyloidablagerungen *in vivo* mit einer Reihe, z. T. schwerwiegender, Proteinfehlfaltungs-krankheiten, wie der Alzheimer-Krankheit oder dem Typ-2-Diabetes, assoziiert ist [Selkoe 2003], [Uversky 2004]. Die gesellschaftliche Relevanz dieser Krankheiten lässt sich u. a. daran festmachen, dass beispielsweise allein in Deutschland die Zahl der Alzheimer-Erkrankten auf ca. 1 Million und die Zahl der Erkrankten mit Typ-2-Diabetes auf rund 6 Millionen geschätzt wird [Hirnliga], [Hauner 2006]. Darüber hinaus ist aufgrund der derzeitigen Entwicklung der Bevölkerungsstruktur mit einer weiter drastisch steigenden Anzahl der Fälle mit solchen Erkrankungen zu rechnen [Hirnliga], [Hauner 2006]. Die enormen Kosten, die mit der Behandlung solcher Erkrankungen für das Gesundheitswesen verbunden sind, stellen sicherlich die Hauptmotivation zur Erforschung der Ursachen und Präventionsmöglichkeiten von Proteinfehlfaltungs- und Aggregationsprozessen dar.

Abgesehen von den pathogenen Konsequenzen, stellen Aggregationsprozesse ein nicht unerhebliches Problem in der Biotechnologie dar. So kommt es im Verlauf biotechnologischer Prozesse wie der Proteinisolierung und -aufreinigung oftmals zu unerwünschter Aggregation, verbunden mit einer Verringerung der Ausbeute oder gar einem Verlust der biologischen Aktivität des Proteins. Auch können Protein-basierte Pharmaka während des Transports und der Lagerung durch Aggregation inaktiviert werden [Chi 2003].

Unter geeigneten Umgebungsbedingungen kann die Aggregation von Proteinen auch gezielt *in vitro* ausgelöst werden [Chiti 1999]. Die auf diese Weise gebildeten, häufig fibrillären Aggregate weisen, unabhängig von der Wahl des Proteins, strukturell bemerkenswerte Ähnlichkeiten mit *ex vivo* extrahierten Aggregaten auf. Diese Beobachtung hat in letzter Zeit zu der Hypothese geführt, dass die Bildung von Amyloidfibrillen eine generische Eigenschaft des Proteinrückgrates darstellt, und dass native Faltung und Aggregation als zwei alternative, kompetitive Stabilisierungsstrategien von destabilisierten, teilweise entfalteten Proteinen angesehen werden können [Dobson 1999a].

Die Vorgehensweisen der Amyloidforschung zur Aufklärung der molekularen Aggregationsmechanismen umfassen unter anderem die gezielte Modulation der Balance zwischen Proteinfaltung und -aggregation durch die Variation verschiedener Umgebungsparameter. Als ein solcher Parameter kommt - in stark vereinfachender Anlehnung an die komplexe Komposition des zellulären Milieus von Proteinen - die Veränderung von Lösungsmittleigenschaften, z. B. durch den Zusatz von Cosolventien, in Betracht [Timasheff 1993]. Je nach Art des Cosolvenszusatzes werden dadurch die chemischen Potentiale der am Aggregationsprozess beteiligten Proteinspezies in unterschiedlicher Weise beeinflusst, so dass bestimmte Faltungs- und Aggregationspfade selektiv begünstigt oder inhibiert werden können. In lebenden Organismen befindet sich ein Protein jedoch in der Regel in einer noch komplexeren Umgebung als in ausschließlich wässriger Lösung mit anderen gelösten Bestandteilen, deren Anwesenheit durch den Zusatz von Cosolventien modelliert werden könnte. Die Beobachtung, dass *in vivo* Amyloidablagerungen in Membran-assoziiierter Form gefunden werden, deutet auf eine kritische Beteiligung von Membranbestandteilen an pathogenen

Aggregationsprozessen hin [Gellermann 2005], [Gorbenko 2006]. Die Frage, wie lipidäre Membrankomponenten das Aggregationsverhalten von Proteinen beeinflussen können, lässt sich *in vitro* anhand von Untersuchungen der Wechselwirkungen von Proteinen mit geeigneten Modellbiomembranen näher beleuchten. Dabei kann die Tatsache ausgenutzt werden, dass sich die physikalischen Eigenschaften von Modellbiomembranen durch die Wahl derer Lipidzusammensetzung gezielt variieren lassen.

Die Anwendung hoher Drücke stellt schließlich ein wertvolles Werkzeug dar, um Einsichten in die volumetrischen Eigenschaften, wie z. B. die molekulare Packung und die Hydratation, der am Aggregationsprozess beteiligten Spezies, zu erlangen. Darüber hinaus kann die Untersuchung von Aggregationsprozessen unter Druck Hinweise auf die molekularen Wechselwirkungsarten liefern, die zur Stabilität der beteiligten Spezies beitragen.

Insulin wird als Peptidhormon in großem Maßstab industriell zur Behandlung von Diabetespatienten produziert. Nicht nur seine Eigenschaften als kleines, amyloidogenes Modellprotein, sondern auch das Auftreten von Amyloidaggregaten bei der Behandlung von Diabetes sowie die Aggregationsanfälligkeit des Proteins bei seiner Produktion und Lagerung machen Insulin zu einem geeigneten Kandidaten zur Untersuchung von Proteinaggregationsprozessen [Störkel 1983], [Dische 1988], [Swift 2002], [Brange 1987]. Die Hauptmotivationen solcher Untersuchungen sind sowohl ein detailliertes Verständnis der Mechanismen, die der Aggregation zu Grunde liegen, als auch ein enormes wirtschaftliches Interesse an der Ermittlung von Strategien, unerwünschte Aggregationsprozesse zu minimieren bzw. unterbinden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Aggregationsverhalten von Rinderinsulin in Abhängigkeit variabler Umgebungsparameter mit Hilfe fluoreszenz- (Anisotropiemessungen und ThT-Assay), CD- und UV-spektroskopischer Methoden untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Cosolventien (Glycerol, Ethanol und TFE) hinsichtlich der nativen Selbstassoziation von Insulin, dessen Entfaltung, Aggregationskinetik und schließlich der Oberflächeneigenschaften der resultierenden Aggregate evaluiert. Hierbei wurden neue mechanistische Informationen zur frühen Aggregationsphase gewonnen. Zudem konnten alternative Aggregationspfade des Proteins in Hinsicht auf

die lösungsmittelabhängigen konformellen Vorzüge partiell entfalteten Insulins charakterisiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Lösungsmittel-modulierte Aggregationsstudien mit Insulin unter Druck durchgeführt. Diese lieferten nicht nur detaillierte mechanistische Einsichten in einen neuartigen, zur Fibrillbildung parallelen, Aggregationspfad, sondern ermöglichten auch die Identifizierung von molekularen Wechselwirkungsarten, die wesentlich zur Stabilität von Insulinspezies in unterschiedlichen Aggregationsstadien beitragen. Darüber hinaus wurden die technologischen Möglichkeiten der Druckbehandlung von Insulinaggregaten näher beleuchtet. Den abschließenden Teil der Arbeit stellen Untersuchungen der Aggregation von Insulin in Gegenwart von Modellbiomembranen dar, in denen der Einfluss variabler physikalischer Eigenschaften von Membranen auf die Aggregationskinetik des Proteins hervorgehoben wird.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Proteinfaltung, -fehlfaltung und -aggregation

Unter physiologischen Bedingungen liegen Proteine im Allgemeinen in ihrer funktionellen, korrekt gefalteten Tertiär- bzw. Quartärstruktur vor. In dieser als nativ bezeichneten Konformation besitzt das Protein seine zur Aufrechterhaltung physiologischer Vorgänge maximale biologische Aktivität. Im lebenden Organismus ist die Faltung einer Polypeptidkette in ihre native Konformation ein Schlüsselereignis, das sich an die Synthese eines Polypeptidstrangs an den Ribosomen anschließt. Häufig wird dieser Prozess durch eine Reihe von Hilfsproteinen, molekularen Chaperonen, katalysiert. Allerdings erfolgt dieser Prozess oft auch *in vitro* spontan in Abwesenheit jeglicher Hilfsproteine. Diese Beobachtung hat zu der Hypothese geführt, dass sämtliche Information über die korrekt gefaltete dreidimensionale Struktur bereits in der Primärstruktur eines Proteins enthalten ist [Anfinsen 1973]. Der Faltungsvorgang ist um viele Größenordnungen schneller abgeschlossen als bei einer reinen Zufallssuche aller möglichen Konformationen auf dem Faltungsweg zu erwarten wäre (Levinthal-Paradoxon) [Levinthal 1968]. Das Levinthal-Paradoxon kann mit Hilfe der Theorie der Energielandschaft, in der die Faltung eines Proteins stattfindet, aufgeklärt werden. Nach dieser Theorie wird der Faltungsweg eines Proteinmoleküls als Trajektorie auf einer Energiehyperfläche angenommen [Dobson 2001]. Die Energiehyperfläche stellt die Freie Energie F aller möglichen Konformationen einer Polypeptidkette als Funktion geeigneter Fortschrittsvariablen zur Beschreibung des Faltungsprozesses dar. Als zweckmäßig erweist sich die Einführung einer ersten Fortschrittsvariablen Q_0 , die den Anteil der Tertiärstruktur stabilisierenden Kontakte im nativen Zustand beschreibt. Eine zweite Fortschrittsvariable C beschreibt die Gesamtzahl vorhandener tertiärer Kontakte. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Energielandschaft (2.1.a) und verschiedene Trajektorien in der Energielandschaft (2.1.b) als Funktion von Q_0 und C für ein Protein, das im Verlaufe seines Faltungsprozesses Faltungsintermediate (I) durchläuft.

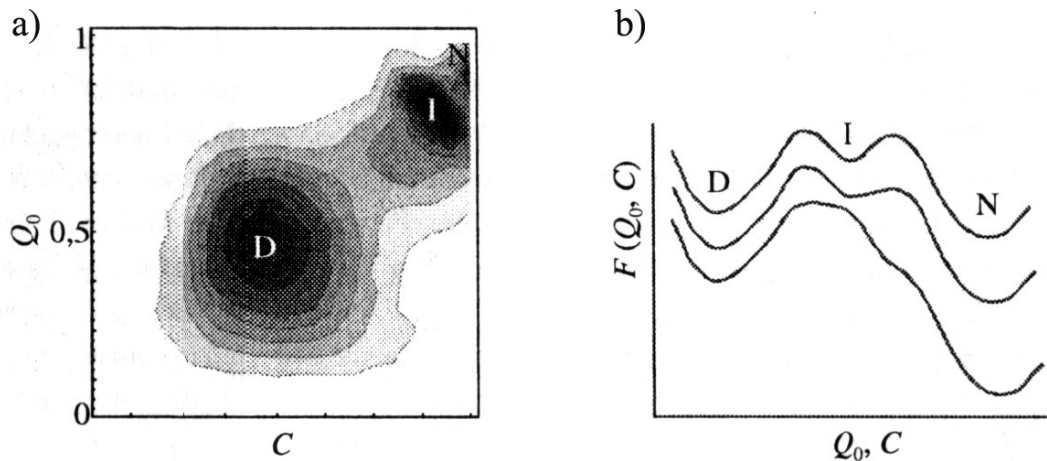


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Energielandschaft eines Proteins als Funktion der Fortschrittsvariablen C und Q_0 . Die drei gekennzeichneten Minima entsprechen denaturierten (D), intermediären (I) und nativen (N) Konformationen. a) Höhenprofil einer Energielandschaft, b) Freie Energie $F(Q_0, C)$ dreier unterschiedlicher Trajektorien in einer Energielandschaft [Dobson 1999b], [Chan 1998], [Pande 1998].

Der denaturierte Zustand eines Proteins zeichnet sich im Energielandschaftsmodell durch eine Vielzahl möglicher Konformationen vergleichbarer Freier Energie aus, so dass die zugängliche Energiehyperfläche sehr groß ist und relativ flach verläuft. Bei Fortschreiten der Faltung unter nativen Bedingungen vermindert sich die Freie Energie des Proteins. Gleichzeitig wird durch die Entstehung neuer intramolekularer Kontakte, getrieben durch Coulomb-, van-der-Waals- und „hydrophobe“ Wechselwirkungen, der dem Protein zugängliche Konformationsraum eingeschränkt, was mit einer Abnahme der Konformationsentropie einhergeht. Das Modell der Energiehyperfläche impliziert die Möglichkeit, dass ausgehend vom großen, heterogenen Konformationsraum im denaturierten Zustand individuelle Moleküle individuellen Trajektorien in der Energielandschaft auf ihrem Weg zur nativen Konformation folgen können. Dabei können auch Faltungsintermediate durchlaufen werden, die durch nicht-native Wechselwirkungen gekennzeichnet sind [Dobson 2001]. Sie stellen lokale Minima auf der Energiehyperfläche dar und sind somit metastabil. Das Erreichen des nativen Zustandes des Einzelmoleküls wird durch die Tatsache vorangetrieben, dass nativ-ähnliche tertiäre Kontakte im Mittel stabiler sind als nicht-native Kontakte [Dinner 2000]. Mit der Annäherung an den nativen Zustand wird das Gefälle der Energiehyperfläche zunehmend steiler, bis das Protein seinen nativen Zustand erreicht hat.

Die Faltung von denaturierten Proteinen bei hohen Konzentrationen führt jedoch häufig nicht in den nativen Zustand, sondern in einen Zustand fehlgefalteter Konformation, in der die Proteine in Konkurrenz zur intramolekularen Faltung nicht-native intermolekulare Wechselwirkungen eingehen können. Die dabei entstehenden Oligomere präzipitieren in vielen Fällen irreversibel als Aggregat. Da Aggregationsprozesse - im Gegensatz zu intramolekularen Faltungsprozessen - mindestens bimolekular verlaufen, werden sie in der Regel mit steigender Proteinkonzentration begünstigt [Fink 1998]. Aggregationsanfällige Faltungsintermediate von Proteinen spielen eine Schlüsselrolle bei der Diskussion von Fehlfaltungs- und -aggregationsprozessen. Für die Existenz solcher Intermediate spricht die aggregationsfördernde Auswirkung von Faktoren, die den nativen Zustand von Proteinen zumindest teilweise destabilisieren und die Generierung von partiell gefalteten Intermediaten mit größerem zugänglichem Konformationsraum begünstigen [Kelly 1998]. Zu diesen Faktoren zählen, zum Beispiel, destabilisierende Punktmutationen in der Polypeptidkette [Booth 1997], extreme pH-Werte [Nielsen 2001a], hohe Temperaturen [Arora 2004], hohe Drücke [Ferrão-Gonzales 2000] und Cosolventien, die die Tertiärstruktur des nativen Proteins zerstören [Chiti 1999]. Die dabei gebildeten, hochenergetischen Spezies weisen häufig „molten globule“-Konformationen mit zerstörter Tertiär-, aber substantiellem Anteil an intakter Sekundärstruktur auf [Ptitsyn 1995], [Fink 1998], [Chiti 1999], [Ferrão-Gonzales 2000]. In Analogie zum Faltungsvorgang führt die Selbstassoziation und Aggregation solcher Spezies unter anderem zu einer Verringerung der lösungsmittlexponierten Oberfläche, der Ausbildung eines hydrophoben Kerns und der intermolekularen Sättigung freier Wasserstoffbrückenbindungs-Plätze [Qu 1998], [Thirumalai 2003]. Die nicht-native Selbstassoziation von Faltungsintermediaten kann daher als eine zur nativen Faltung alternative Strategie zur Minimierung der Freien Energie des Systems angesehen werden [Dobson 1999a]. Nach Fink [Fink 1998] lassen sich Proteinaggregate nach dem Ort ihrer Entstehung in „*in vivo*“ und „*in vitro*“ gebildet“, sowie nach ihrer Morphologie in „amorph“ und „strukturiert“, unterteilen. *In vivo* gebildeten Aggregaten kommt eine besondere biologische Bedeutung zu, denn sie sind potentiell pathogen. In intakten lebenden Zellen werden Aggregationsvorgänge normalerweise effektiv durch molekulare Chaperone verhindert, die naszierende Polypeptidketten isolieren und somit

unerwünschte intermolekulare Wechselwirkungen unterbinden [Ellis 1999]. Des Weiteren existieren Regelmechanismen zum proteolytischen Abbau von fehlgefalteten Proteinen. In weniger intakten Zellen können diese Regelmechanismen gestört sein, so dass sich partiell gefaltete Intermediate anhäufen können und sich unter Bildung unlöslicher Proteinaggregate ablagern [Stefani 2003]. In Abbildung 2.2 sind vereinfachend die Zusammenhänge zwischen den an Faltungs- und Aggregationsprozessen beteiligten Proteinspezies *in vivo* dargestellt.

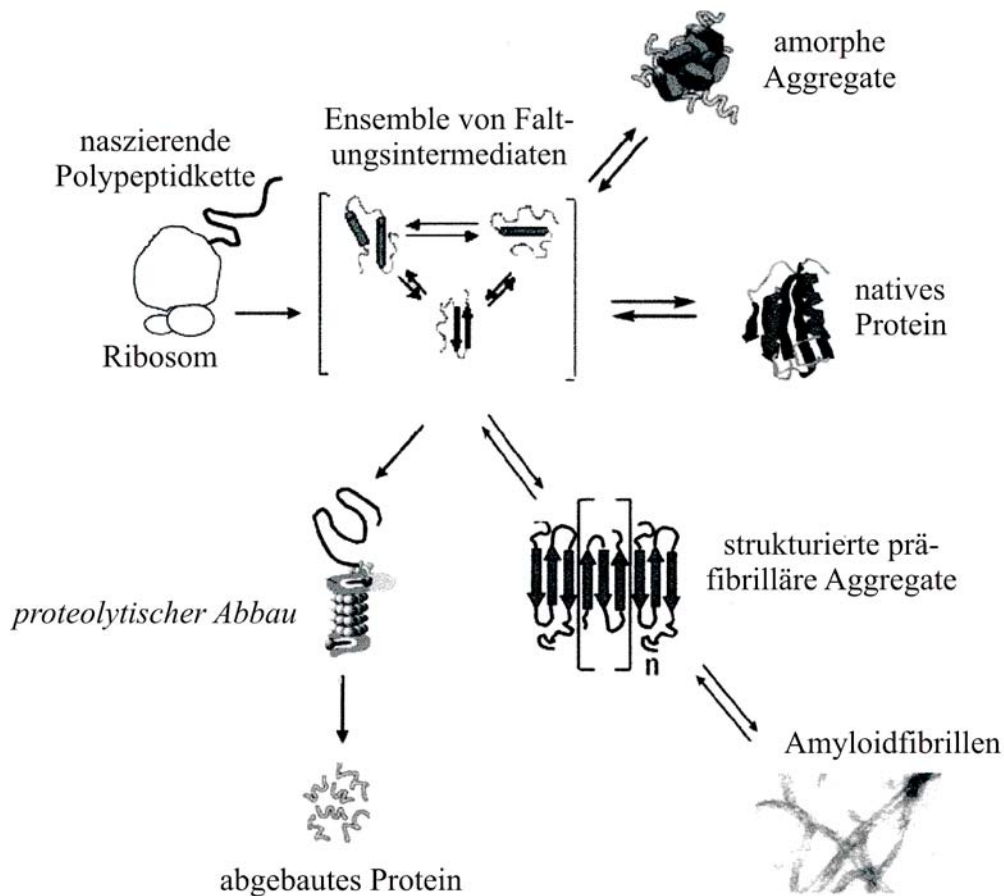


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den an Proteinfaltungs- und Proteinaggregationsprozessen *in vivo* beteiligten Proteinspezies (modifiziert nach [Stefani 2003]).

Der *in vivo*-Bildung von strukturell wohldefinierten Aggregaten gilt ein besonderes Interesse. Zum ersten Mal wurden solche, *post mortem* aus Gewebe entnommenen, Aggregate von Virchow charakterisiert und als „Amyloid“ (= „stärkeähnlich“) bezeichnet [Sipe 2000]. Heutzutage werden unter dem Begriff „Amyloid“ fibrilläre,

fehlgefaltete Aggregate ursprünglich löslicher Proteine zusammengefasst, die sich bei bestimmten degenerativen Krankheiten (Amyloidosen), in verschiedenen Organen ablagern [Selkoe 2003]. Die regelmäßige Packung des Polypeptidrückgrates der konstituierenden Proteinmonomere in β -Strangkongformation senkrecht zur langen Fibrillachse („cross- β -Konformation“) resultiert in einem - parallel zur langen Fibrillachse laufenden - protofilamentösen β -Faltblattmotiv. Durch die laterale Zusammenlagerung mehrerer Filamente entstehen Fibrillen mit Durchmessern von 3-15 nm und mehreren 100 nm Länge, die ein charakteristisches Röntgenbeugungsmuster hervorrufen [Sunde 1997], [Sunde 1998]. In Abbildung 2.3 ist beispielhaft das Modell einer Insulinfibrille dargestellt.



Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der β -Strang-Anordnung von Insulin in einer aus vier Protofilamenten bestehenden Fibrille (modifiziert nach [Jiménez 2002]).

Gemeinsam sind Amyloidaggregaten neben ihrer fibrillären Morphologie die Schwerlöslichkeit in Wasser, eine hohe Beständigkeit gegen Temperatur, Druck und Proteasen sowie die Fähigkeit, die spektralen Eigenschaften bestimmter Farbstoffe (z. B. Thioflavin T und Kongorot), in charakteristischer Weise zu beeinflussen. Fibrilläre Aggregate mit bemerkenswert ähnlichen Eigenschaften werden aber auch von einer Reihe von sequentiell nicht homologen Proteinen, die nicht mit Proteinfehlfaltungskrankheiten assoziiert sind, und Homopolypeptiden unter geeigneten Bedingungen *in vitro* gebildet [Chiti 1999], [Fändrich 2001], [Fändrich 2002]. Diese Beobachtung hat zu der Hypothese geführt, dass die Bildung von Fibrillen eine generische „polymere“ Eigenschaft von Proteinen darstellt, die dann in Erscheinung tritt, wenn intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Polypeptidrückgraten über spezifische Seitenkettenkontakte innerhalb des nativen Proteins dominieren [Dobson 1999a], [Fändrich 2002].

Im Folgenden soll näher auf verschiedene Faktoren eingegangen werden, die die Balance zwischen nativer Faltung und der nicht-nativen Selbstassoziation von Proteinen modulieren können.

2.2 Druck- und Temperatureffekte auf Proteinfaltung und -aggregation

Die Destabilisierung des nativen Zustandes eines Proteins führt zu einer Abnahme der stabilisierenden intramolekularen Kontakte, womit eine Vergrößerung des dem Protein zugänglichen Konformationsraumes einher geht. Die Störung der nativen Kontakte kann unter anderem durch eine Veränderung der Systemparameter Druck und Temperatur hervorgerufen werden. Der Einfluss dieser Variablen auf die thermodynamische Stabilität einer Proteinkonformation kann unter Nichtberücksichtigung intermolekularer Wechselwirkungen in einfachster Näherung auf der Grundlage eines Zwei-Zustands-Modells beschrieben werden. Wenn lediglich die native (N) und die denaturierte (D) Konformation des Proteins makroskopische Zustände repräsentieren, lässt sich die thermodynamische Stabilität eines Proteins über die Differenz der Standard Freien Enthalpie, ΔG_D^0 , zwischen denaturiertem und nativem Zustand beschreiben. Sie setzt sich zusammen aus enthalpischen (ΔH_D^0) und entropischen (ΔS_D^0) Beiträgen zur Proteinstabilität und ist bei gegebener Temperatur T folgendermaßen mit der Gleichgewichtskonstanten K_D verknüpft:

$$\Delta G_D^0 = -RT \ln K_D = \Delta H_D^0 - T \Delta S_D^0 \quad (2.1)$$

mit R: allgemeine Gaskonstante.

In Abhängigkeit von Druck (p) und Temperatur (T) als variablen Parametern ergibt sich im Allgemeinen eine elliptische Gestalt für das Zustandsdiagramm eines Proteins nach dem Zwei-Zustands-Modell [Hawley 1971]. Ein solches Zustandsdiagramm ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt.

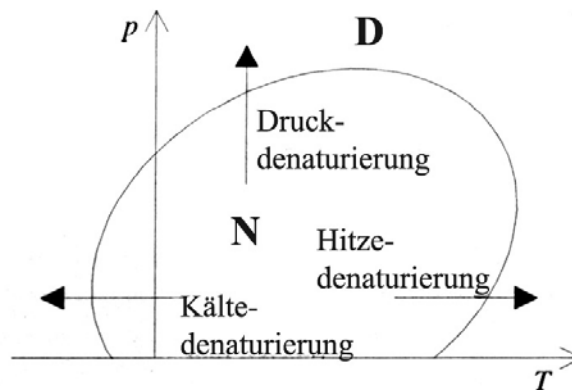


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Zustandsdiagrammes eines Proteins nach dem Zwei-Zustands-Modell.

In einem solchen Zustandsdiagramm liegt der native Zustand innerhalb der Ellipse ($\Delta G_D^0 > 0$). Bei ausreichender Druckerhöhung sowie Temperaturerhöhung bzw. -erniedrigung wird die Stabilitätsgrenze zum denaturierten Zustand überschritten, und ΔG_D^0 wird negativ.

In integrierter Form erhält man aus der Fundamentalgleichung der Thermodynamik in einfachster Näherung folgenden Zusammenhang zwischen der Standard Freien Entfaltungsenthalpie eines Proteins und den Zustandsvariablen Druck und Temperatur [Smeller 2002]:

$$\Delta G_D^0 = \Delta G_{D,0}^0 - \Delta S_{D,0}^0 (T - T_0) + \Delta V_{D,0}^0 (p - p_0) \quad (2.4)$$

p_0 und T_0 sind Druck und Temperatur bei Referenzbedingungen, unter denen das Protein in seiner nativen Konformation vorliegt, während $\Delta G_{D,0}^0$, $\Delta S_{D,0}^0$ und $\Delta V_{D,0}^0$ die Standard Freie Enthalpiedifferenz, die Standard-Entropiedifferenz und die Standard-Volumendifferenz zwischen denaturiertem und nativem Zustand unter diesen Bedingungen angeben. Die temperaturinduzierte Denaturierung bei konstantem Druck ist demnach ein entropisch getriebener Prozess, zu dem insbesondere die Konformationsentropie von Proteinsegmenten im denaturierten Zustand beiträgt. Demgegenüber werden unter Druckeinwirkung bei konstanter Temperatur nach dem Prinzip von Le Châtelier Konformationen mit einem kleinen Volumen begünstigt. Eine

Volumenverminderung wird generell beim druckinduzierten Übergang von der nativen in denaturierte Proteinkonformationen in wässriger Lösung beobachtet. Dieses Phänomen beruht auf mehreren Effekten [Royer 2002]:

- Unter Druck dringt Wasser in das Proteininnere und eliminiert so interne Hohlräume.
- Da die Dissoziation von Ionenpaaren im Allgemeinen mit einer Volumenverringern einhergeht (Elektrostriktion), werden diese unter Druck destabilisiert.
- Die Hydratisierung von polaren Seitenketten ist mit einer Volumenverringern verbunden. Darüber hinaus konnte anhand von theoretischen Studien gezeigt werden, dass unter Druck auch die Hydratisierung unpolarer Proteinbereiche begünstigt werden kann [Hummer 1998].

Alle drei Effekte resultieren in einer Nettodestabilisierung von kompakten Sekundär- und Tertiärstrukturelementen, die im nativen Zustand zudem durch - allerdings weitgehend druckunempfindliche - intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Einige der bei biochemischen Teilreaktionen auftretenden Volumenänderungen sind in Tabelle 2.1 angegeben.

Die Triebkräfte der Denaturierung – Entropieerhöhung im Falle der temperaturinduzierten und Volumenverminderung im Falle der druckinduzierten Denaturierung – sind abhängig von der eingesetzten Denaturierungsmethode. Daher werden dem Protein je nach Art der Denaturierungsmethode unterschiedliche Konformationsräume zugänglich. Im Vergleich zu temperaturdenaturierten Zuständen weisen druckdenaturierte Zustände häufig eine kompaktere Konformation auf [Smeller 2002], [Boonyaratanakornkit 2002]. Druck stellt somit neben der Temperatur ein wertvolles Instrument zur Generierung und Untersuchung potentiell aggregationsanfälliger Faltungsintermediate dar, die eine Schlüsselposition bei Aggregationsprozessen einnehmen [Smeller 1999], [Ferrão-Gonzales 2000].

Tabelle 2.1: Reaktionsvolumina einiger biochemischer Reaktionen [Gross 1994].

Reaktion	Beispiel	$\Delta V /$ $\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1}$
Protonierung/ Ionenpaarbildung	$\text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ $\text{Protein-COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Protein-COOH}$ $\text{Protein-NH}_3^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{Protein-NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$	+ 21,3 + 10 + 20
H-Brückenbildung	Poly(L-Lysin) (Helixbildung)	- 1
Hydratisierung hydrophober Gruppen	$\text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow (\text{C}_6\text{H}_6)_{\text{Wasser}}$ $(\text{CH}_4)_{\text{Hexan}} \rightarrow (\text{CH}_4)_{\text{Wasser}}$	- 6,2 - 22,7
Hydratisierung polarer Gruppen	$\text{n-Propanol} \rightarrow (\text{n-Propanol})_{\text{Wasser}}$	- 4,5

Unter Druck wird der Denaturierungsprozess von Proteinen bei Raumtemperatur im Allgemeinen erst durch Drücke im Bereich von $p \approx 3\text{-}10$ kbar induziert. Abgesehen davon, äußern sich Druckeffekte im Zusammenhang mit Proteinaggregationsprozessen auch in einer Beeinflussung intermolekularer Wechselwirkungen. Diese werden meist bereits bei Drücken im Bereich unterhalb von $p \approx 2$ kbar destabilisiert, was eine Dissoziation nativer oligomerer Proteinstrukturen sowie die Inhibierung von nicht-nativen Aggregationsprozessen zur Folge haben kann [Silva 1993], [Gorovits 1998], [Foguel 1999]. Die Triebkraft der druckinduzierten Dissoziation nativer Proteinkomplexe definierter Stöchiometrie und nicht-nativer Aggregate resultiert vor allem aus einer Verminderung des Volumens durch Eliminierung von Packungsdefekten an der Grenzfläche zwischen den monomeren Untereinheiten. Hochdruckuntersuchungen der Stabilität von Proteinaggregaten können demnach Aufschluss über Packungsmoden der konstituierenden Monomere geben. Zudem lässt das Hochdruckverhalten von Aggregaten aufgrund der unterschiedlichen Druckempfindlichkeit verschiedener intermolekularer Wechselwirkungsarten (siehe Tabelle 2.1) häufig Rückschlüsse auf deren Relevanz für die Stabilität des Aggregates zu. Schließlich bietet die Möglichkeit, Aggregationsprozesse unter Hochdruck zu inhibieren, interessante technische Anwendungsmöglichkeiten, wie z. B. die Inaktivierung von Virushüllen oder die Rückfaltung von bei biotechnologischen Prozessen anfallenden Faltungsaggregaten [Prevelige 1994], [St. John 1999].

Nach dem Prinzip von Le Châtelier lässt sich, in zur thermodynamischen Betrachtung analoger Weise, auch der Einfluss von Druck auf die Kinetik von Aggregationsprozessen interpretieren. Es gilt:

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT}, \quad (2.5)$$

mit k : Geschwindigkeitskonstante für einen Aggregationsprozess.

Demnach werden unter Druck Aggregationsprozesse beschleunigt (verlangsamt), die mit einem negativen (positiven) Aktivierungsvolumen, ΔV^\ddagger , einher gehen. In diesem Fall lassen druckabhängige Untersuchungen der Kinetik von Aggregationsprozessen Rückschlüsse über die volumetrischen Eigenschaften (wie z. B. Packung und Hydratisierung) der Übergangszustände zwischen den am Aggregationsprozess beteiligten Proteinspezies zu.

2.3 Cosolvenseffekte auf Proteinfaltung und -aggregation

Die Umgebung von Proteinen *in vivo* stellt ein komplexes Multikomponentensystem dar, das neben Wasser auch verschiedenste gelöste Stoffe wie Salze, Zucker, Aminosäuren und andere kleine Moleküle enthält, die nachfolgend als Cosolventien bezeichnet werden. In der Regel werden solche Cosolventien in der Natur zur Regulation der Stabilität von Proteinen vor dem Hintergrund extremer Umweltbedingungen wie pH-Wert, Druck oder Temperatur eingesetzt [Timasheff 1993]. Im Folgenden soll der Effekt von Cosolventien auf die Faltung und Aggregation von Proteinen thermodynamisch charakterisiert werden.

In einem Drei-Komponenten-Modell, das durch die Komponenten Lösungsmittel (Index: 1), Protein (Index: 2) und Cosolvens (Index: 3) beschrieben wird, ist die Freie Transferenthalpie, $\Delta\mu_{2, \text{tr}}$, für die Überführung eines Proteins aus reinem Lösungsmittel (Wasser) in ein Cosolvenssystem folgendermaßen definiert:

$$\Delta\mu_{2, \text{tr}} = \mu_2(\text{Cosolvens}) - \mu_2(\text{Wasser}) \quad (2.6)$$

Hierbei ist μ_i das chemische Potential der Komponente i .

Die Freie Transferenthalpie lässt sich bei gegebener molaler Konzentration, m_3 , des Cosolvens explizit berechnen:

$$\Delta\mu_{2, \text{tr}} = \int_0^{m_3} \left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, p, m_2} dm_3, \quad (2.7)$$

Zur Berechnung der Änderung des chemischen Potentials des Proteins mit der Cosolvenskonzentration wird der bevorzugte Bindungsparameter eingeführt:

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{p, T, \mu_3} = - \frac{\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, p, m_2}}{\left(\frac{\partial\mu_3}{\partial m_3} \right)_{T, p, m_2}} \quad (2.8)$$

Es kann gezeigt werden, dass sich Cosolventien thermodynamisch einteilen lassen in

- a) Stabilisatoren (Kosmotrope): $\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, p, m_2} > 0$ und $\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{p, T, \mu_3} < 0$,
- b) Denaturantien (Chaotrope): $\left(\frac{\partial\mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, p, m_2} < 0$ und $\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{p, T, \mu_3} > 0$.

Der Zusatz von Stabilisatoren, wie z. B. Glycerol, erhöht demnach das chemische Potential von Proteinspezies. Gleichzeitig werden Stabilisatoren bevorzugt von deren Oberfläche ausgeschlossen, d. h., Proteine liegen in Gegenwart von Stabilisatoren stärker hydratisiert vor [Timasheff 2002]. Im Gegensatz dazu setzt der Zusatz von Denaturantien, wie z. B. Harnstoff, das chemische Potential von Proteinspezies herab, und die Konzentration des Denaturans ist an der Proteinoberfläche größer als in der umgebenden *bulk*-Lösung. Für die Wirkung als Stabilisator bzw. Denaturans sind meist Konzentrationen im Bereich von einigen mol/l erforderlich, da deren Wechselwirkung mit Proteinen in der Regel weder stark noch spezifisch sind [Timasheff 1993]. Die molekularen Ursachen für bevorzugten Ausschluss oder bevorzugte Bindung werden von der chemischen Natur des eingesetzten Cosolvens geprägt und sollen am Beispiel

der in dieser Arbeit verwendeten Cosolventien Glycerol, EtOH und TFE in Kapitel 5 detaillierter diskutiert werden.

Das Ausmaß an bevorzugtem Ausschluss und bevorzugter Bindung steigt nicht nur mit der Cosolvenskonzentration, sondern ist näherungsweise auch proportional zur lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des Proteins [Timasheff 1998]. Betrachtet man ein Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen A und B eines Proteins, so entspricht die Änderung der Standard Freien Enthalpieänderung zwischen beiden Zuständen, $\Delta\Delta G_{A-B}^{\theta}$, der Differenz der Freien Transferenthalpien zwischen beiden Zuständen:

$$\Delta\Delta G_{A-B}^{\theta} = \Delta G_{A-B}^{\theta}(\text{Cosolvens}) - \Delta G_{A-B}^{\theta}(\text{Wasser}) = \Delta\mu_{B,\text{tr}} - \Delta\mu_{A,\text{tr}} \quad (2.8)$$

Dieser Zusammenhang ist schematisch für die Wirkungsweise von Stabilisatoren und Denaturantien in Abbildung 2.5 dargestellt.

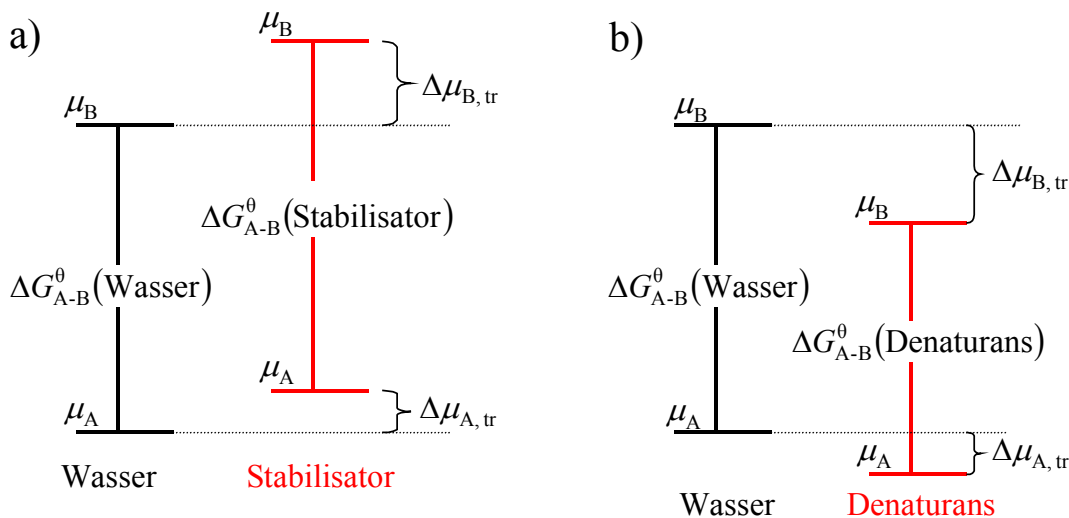


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Einflusses von a) Stabilisatoren und b) Denaturantien auf die chemischen Potentiale von Proteinen. In den dargestellten Fällen repräsentiert der Zustand B denjenigen mit der größeren lösungsmittlexponierten Oberfläche, so dass das Ausmaß an bevorzugtem Ausschluss bzw. bevorzugter Bindung größer als im Zustand A ist. Dieses Szenario trifft beispielsweise auf den Denaturierungsvorgang von Proteinen zu, in dem A den nativen und B den denaturierten Zustand repräsentieren würde.

Aus Abbildung 2.5 wird ersichtlich, dass bei Zusatz von Stabilisatoren Gleichgewichte auf die Seite von Proteinspezies mit kleinerer zugänglicher Oberfläche, z. B. nativen Proteinen, oligomeren Assoziaten oder Aggregaten [Yang 1999], verschoben werden, während bei Zusatz von Denaturantien Zustände mit größerer zugänglicher Oberfläche, z. B. (teilweise) entfaltete Proteine, bevorzugt werden [Chi 2003], [Moelbert 2004]. Analoge Überlegungen gelten für den Einfluss verschiedener Cosolventien auf die Kinetik von Faltungs- und Aggregationsprozessen, für deren Interpretation auch die Übergangszustände für deren wechselseitige Umwandlung mit einbezogen werden müssen. Die differentielle Modulation der chemischen Potentiale der, an komplexen Aggregationsvorgängen beteiligten, Proteinspezies kann zum einen die Balance zwischen Proteinfaltung und -aggregation beeinflussen und zum anderen zu einer Bevorzugung einzelner, konkurrierender Aggregationspfade führen. Das Beschreiten distinkter Aggregationspfade kann sich letztlich in einer Beeinflussung der Aggregationsgeschwindigkeit oder im Cosolvens-abhängigen Polymorphismus der resultierenden Aggregate äußern [Nielsen 2001b], [Goldsbury 1997], [Goldsbury 2005].

2.4 Einfluss von Lipidmembranen auf das Aggregationsverhalten von Proteinen

Die Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Proteinen in Gegenwart von Cosolventien *in vitro* implementiert deren räumlich uneingeschränkte Diffusion in homogener Umgebung. In lebenden Organismen sind dagegen das Vorkommen und die Funktion von Proteinen in der Regel lokal auf wohldefinierte Kompartimente beschränkt, die durch biologische Membranen abgegrenzt werden. Membranen stellen jedoch nicht nur passive Barrieren zur Abgrenzung zwischen Reaktionsräumen verschiedener Zusammensetzungen dar, sondern sind auch in vielfältiger Weise - im Zusammenspiel mit spezialisierten Proteinen - aktiv an essentiellen biologischen Prozessen, wie z. B. Signaltransduktion und Stofftransport, beteiligt [Löffler 1998]. Nach dem Fluid-Mosaik-Modell sind biologische Membranen Systeme aus quasi-zweidimensional organisierten Lipiddoppelschichten, die eine asymmetrische, dynamische Matrix für verschiedenste periphere und integrale Proteine darstellen [Singer 1972]. Die Organisation einer biologischen Membran nach dem Fluid-Mosaik-Modell ist in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt.

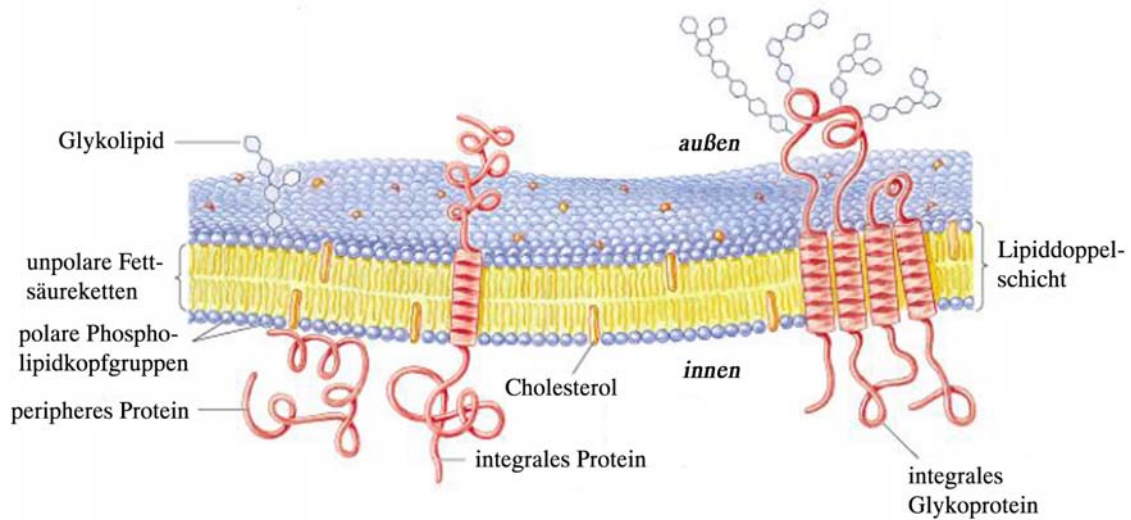
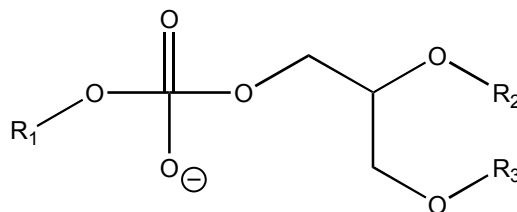


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Organisation einer biologischen Membran nach dem Fluid-Mosaik-Modell (modifiziert nach [Marcotte]).

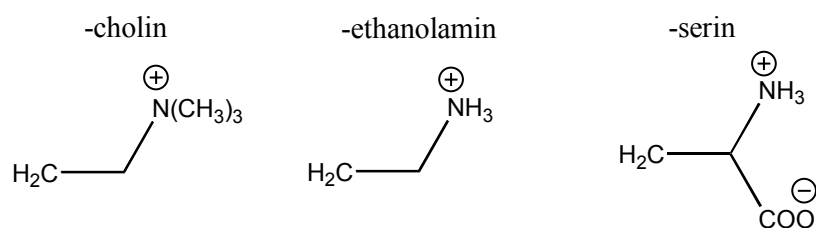
Glycerophospholipide, deren Struktur in Tabelle 2.1 dargestellt ist, und Cholesterin stellen die Hauptbestandteile der lipidären Matrix von biologischen Membranen dar.

Tabelle 2.2: Allgemeine Strukturformel von Glycerophospholipiden sowie Struktur der Kopfgruppen und Fettsäurereste der, im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten, Lipide bei physiologischem pH-Wert.

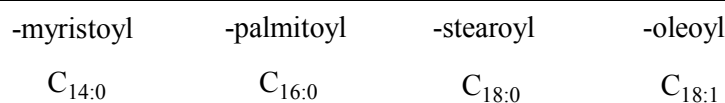
Allgemeine Struktur:



Kopfgruppen (R₁):



Fettsäurereste (R₂, R₃):



Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von biologischen Membranen werden maßgeblich durch die genaue Zusammensetzung der Lipidkomponenten moduliert, was sich letztendlich in einer umgebungsangepassten Regulation der natürlichen Funktion von Membranproteinen äußern kann [Zidovetzki 1997]. In letzter Zeit mehren sich darüber hinaus die Anzeichen dafür, dass Wechselwirkungen mit biologischen Membranen auch eine entscheidende Rolle für das Aggregationsverhalten von amyloidogenen Proteinen *in vivo* spielen. Es konnte zum Einen gezeigt werden, dass aggregierte Konformationen von amyloidogenen Proteinen zytotoxische Auswirkungen auf Zellkulturen haben können [Bucciantini 2002], [Bucciantini 2004], [Kayed 2003]. Aus *in vitro*-Studien mit Modellbiomembranen geht zudem hervor, dass solche Aggregate die Integrität von Membranen zerstören können, indem sie z. B. deren Permeabilität erhöhen und somit die natürliche Bilanz transmembraner Stoffströme in pathogener Weise verändern [Stefani 2003], [Bucciantini 2004]. Zum Anderen sind für einige amyloidogene Proteine Membran-induzierte Konformationsänderungen dokumentiert, die mit einer Beschleunigung der Proteinaggregation und Fibrillbildung korrelieren [Zhu 2003], [Jayasinghe 2005]. Die zu Grunde liegenden Wechselwirkungen zwischen Protein und Membran scheinen in kritischer Weise von der Komposition der Membran beeinflusst zu werden, wie beispielsweise die bevorzugte *in vivo*-Assoziation amyloidogener Proteine mit Cholesterol-reichen Membrandomänen [Gellermann 2005] oder die Präferenz für negativ geladene Modellmembranen implizieren [Zhu 2003], [Zhao 2004], [Knight 2004].

In der gegenwärtigen Literatur deutet ein Konsens aus einer Vielzahl von Untersuchungen an unterschiedlichsten Protein- / Membransystemen auf eine schrittweise ablaufende Aggregation amyloidogener Proteine in Gegenwart von Lipidmembranen hin [Gorbenko 2006]. Diese Schritte umfassen in der Regel die Adsorption des Proteins an die Membran, eine Konformationsänderung des adsorbierten Proteins – häufig eine teilweise Entfaltung – sowie die anschließende Keimbildung und das Fibrillwachstum an der Membranoberfläche. Die Relevanz verschiedener Protein- / Membran-Wechselwirkungsarten sowie die zu Grunde liegenden Wechselwirkungsmechanismen lassen sich systematisch an geeigneten Modellmembranen definierter Zusammensetzung, wie sie beispielsweise unilamellare Lipidvesikel darstellen,

evaluieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einige, im Folgenden kurz dargelegten, Aspekte dazu näher beleuchtet.

a) Dynamik der Lipide

Lamellare Phasen aus hydratisierten Lipiddoppelschichten stellen die in der Natur wichtigste Aggregatform von Phospholipiden dar, die *in vitro* in Form unilamellarer Vesikel modelliert werden kann. Betrachtet man das thermotrope Verhalten solcher Phasen, so tritt bei der Hauptumwandlungstemperatur T_m ein Übergang von der Gelphase in die fluide Phase auf, der mit einem deutlichem Anstieg der Dynamik der Lipidmoleküle einher geht. Diese äußert sich in einer Zunahme der lateralen und Rotationsdiffusion sowie der Segmentmobilität der Lipidmoleküle [Winter 1998]. Bei T_m koexistieren Lipidomänen in Gel- und fluider Phase, und im Zuge der dynamischen Umwandlung zwischen beiden Phasen treten Grenzliniendefekte in Erscheinung. Es wird häufig beobachtet, dass z. B. die Permeabilität von Modellmembranen für verschiedene Substanzen aufgrund des maximalen Auftretens von Grenzliniendefekten bei T_m ebenfalls maximal wird [Lasic 1993]. Die Untersuchung des Aggregationsverhaltens amyloidogener Proteine in der Nähe von T_m kann demnach Informationen über die Relevanz von Grenzliniendefekten als eine Triebkraft für eine mögliche (partielle) Proteininsertion liefern.

b) Kettenlänge der Lipide

Die Variation der Länge der Acylketten von Phospholipiden bei gleicher Kopfgruppe beeinflusst neben T_m (i. A. Zunahme von T_m mit steigender Kettenlänge) auch die Dicke des hydrophoben Bereiches von Lipiddoppelschichten. Beobachtungen legen nahe, dass die Membraninsertion von Proteinen, unter anderem, durch das Ausmaß des sog. „hydrophobic matching“ moduliert werden kann [Jensen 2004]. Das Konzept des „hydrophobic matching“ beschreibt die Situation, dass sich die Dicke des hydrophoben Bereiches der isolierten Lipiddoppelschicht von der eines Membranproteins unterscheidet. Hinsichtlich der Konformation der Lipide kann z. B. durch Stauchung oder Streckung der Acylketten eine Anpassung („matching“) der hydrophoben Dicke der Lipiddoppelschicht an die des Membranproteins erfolgen, um den energetisch ungünstigen „mismatched“ Zustand zu vermeiden (Abbildung 2.7).

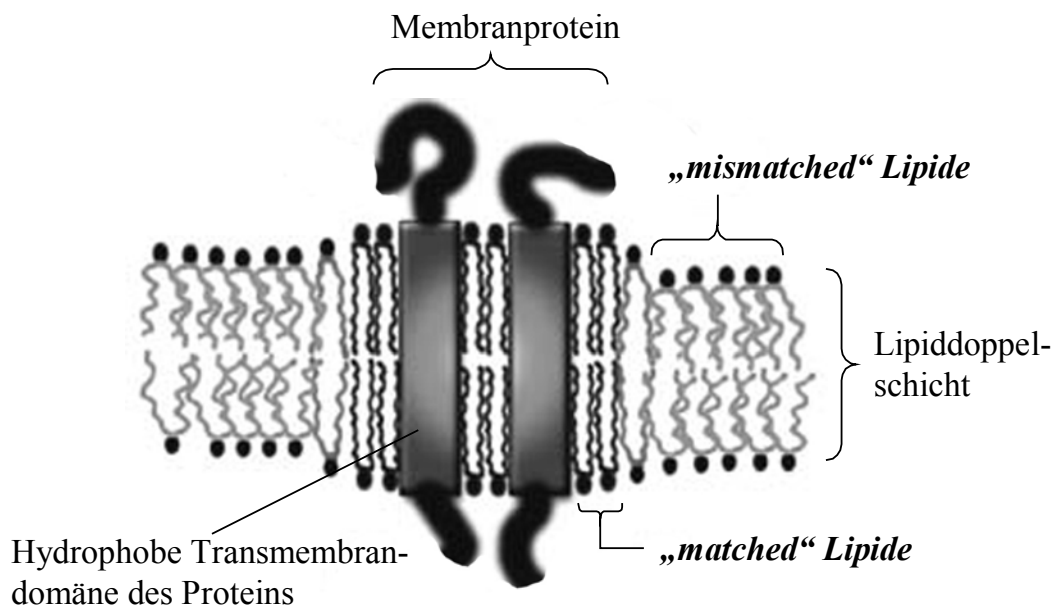


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Prinzips des „hydrophobic matching“ zwischen einem Membranprotein und einer Lipiddoppelschicht (modifiziert nach [Eurekah]).

Experimentell können durch die Wahl von Lipiden unterschiedlicher Kettenlängen (im Rahmen dieser Arbeit: C_{14} – C_{18}) das Ausmaß an „matching“ vorgegeben und die Konsequenzen für die Wechselwirkung des amyloidogenen Proteins mit der jeweiligen Membran untersucht werden (z. B. [Harroun 1999]). Dieses Vorgehen wird insbesondere durch die Tatsache motiviert, dass für verschiedene amyloidogene Proteine in aggregierter Form nach Membraninsertion die Bildung von transmembranen Poren als Mechanismus zur Zerstörung der Membranintegrität vorgeschlagen wird [Caughey 2003].

c) Elastischer Krümmungsstress

Phospholipide, deren Querschnittsflächen von Kopfgruppe und Lipidketten näherungsweise übereinstimmen (z. B. Phosphatidylcholine), bilden in wässriger Lösung bei hohem Wassergehalt aufgrund ihrer Zylindergestalt bevorzugt planare Lipiddoppelschichten. Dagegen neigen Phospholipide, die eine im Verhältnis zur Querschnittsfläche der Lipidketten kleine Querschnittsfläche der Kopfgruppe aufweisen (z. B. Phosphatidylethanolamine), zur Bildung invers-hexagonaler Lipidphasen. Der

Einbau solcher Lipide in planare Lipiddoppelschichten resultiert in einer Frustration der Doppelschicht unter Aufbau von elastischem Krümmungsstress. Die Insertion von Proteinen in solche Membranen kann thermodynamisch begünstigt sein, da sie mit einer lokalen Krümmungsrelaxation der Membran einher geht, im Zuge derer der Krümmungsstress teilweise abgebaut werden kann [Stubbs 1996], [Hui 1997]. In Abbildung 2.8 sind schematisch die Entstehung von Krümmungsstress und deren Abbau durch Proteininsertion in Membranen dargestellt.

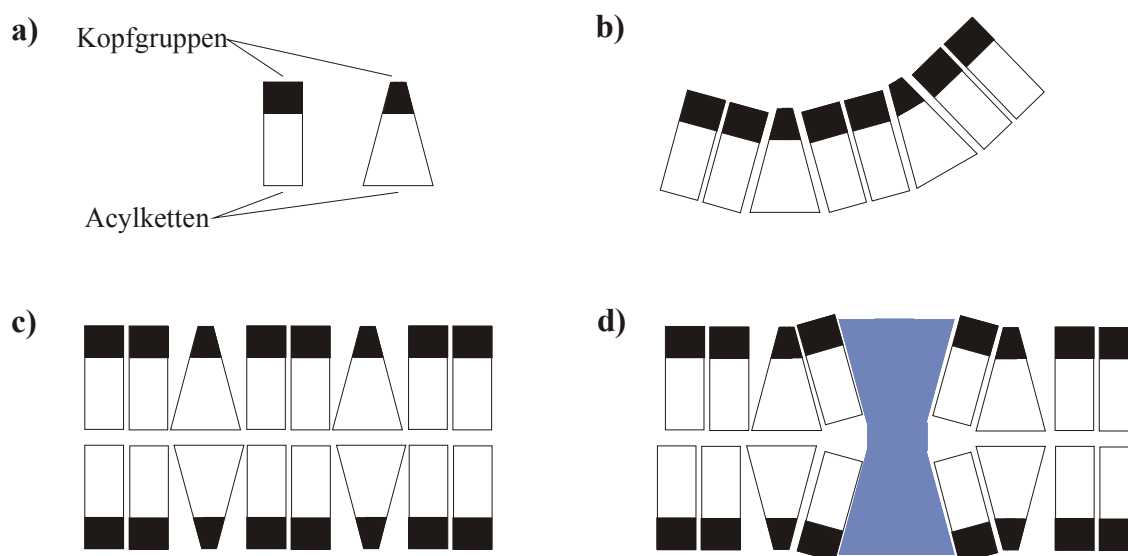


Abbildung 2.8: Hochgradig schematische Darstellung der Entstehung und des Abbaus von Krümmungsstress in Lipidmembranen. a) Schematische Darstellung von Lipiden, die eine lamellare (links) bzw. invers-hexagonale Packung (rechts) bevorzugen; b) Entstehung von spontaner negativer Krümmung in einer Lipidmonoschicht; c) Krümmungs-frustrierte Lipiddoppelschicht; d) lokal Krümmungs-relaxierte Lipiddoppelschicht nach Insertion eines Membranproteins (blau).

Motiviert wird die Untersuchung des Einflusses von Krümmungsstress auf das Aggregationsverhalten amyloidogener Proteine z. B. durch die Beobachtung, dass der Abbau von Krümmungsstress eine wesentliche Triebkraft der Wechselwirkung zwischen dem amyloidogenen Protein α -Synuclein und stark gekrümmten Phospholipid-Vesikeln darstellt [Nuscher 2004].

d) Einfluss von Ladungen

Durch den Einbau elektrisch geladener Lipide (z. B. negativ geladener Phosphatidylserine bei physiologischem pH-Wert) kann das elektrostatische Potential von Membranen reguliert werden. Nach der Theorie der diffusen Doppelschicht ist in Lösung die Konzentration von Gegenionen direkt an einer elektrisch geladenen Oberfläche am größten und nähert sich mit zunehmender Entfernung dem Wert in der *bulk*-Lösung an [Atkins 1998]. Eine Oberflächenanreicherung von amyloidogenen Proteinen infolge attraktiver elektrostatischer Wechselwirkungen wird als eine Hauptursache für den aggregationsbeschleunigenden Effekt negativ geladener Lipidmembranen bei physiologischen pH-Werten diskutiert [Gorbeko 2006]. Daneben scheint aufgrund des lokal niedrigen pH-Wertes an der Oberfläche solcher Membranen die teilweise Entfaltung adsorbierter Proteine begünstigt zu sein. Die Relevanz elektrostatischer Wechselwirkungen für Proteinaggregationsprozesse in Gegenwart elektrisch geladener Lipidmembranen lässt sich anhand des Effektes von Ladungsabschirmung, z. B. durch den Zusatz von Salzen, verifizieren.

2.5 Insulin

Insulin ist ein kleines Peptidhormon, das in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse von allen Wirbeltieren sowie Weichtieren und Einzellern gebildet wird und gemeinsam mit seinem Antagonisten Glucagon den Blutzuckerspiegel innerhalb bestimmter physiologischer Grenzen konstant hält. Nach Bindung an einen spezifischen Insulin-Rezeptor setzt Insulin eine Signaltransduktionskaskade in Gang, die letztlich zu einem gesteigerten Glukose-Verbrauch und somit zum Absinken des Blutzuckerspiegels führt [Löffler 1998].

Die Primärstruktur des Insulins wurde 1953 erstmals vollständig sequenziert [Sanger 1953]. Im zweikettigen Polypeptid ist die 21 Aminosäuren umfassende A-Kette über zwei Disulfidbrücken mit einer B-Kette aus 30 Aminosäuren verknüpft. Eine weitere Disulfidbrücke wird innerhalb der A-Kette zwischen den Cysteinresten in Position 6 und 11 ausgebildet. Die Unterschiede in den Primärstrukturen der Insulinmoleküle aus verschiedenen Organismen sind gering. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Rinderinsulin unterscheidet sich in der Sequenz Ala-Ser-Val in Position 8-

10 der A-Kette gegenüber der entsprechenden Sequenz Thr-Val-Ile und in Ala statt Thr am C-terminalen Ende von Humaninsulin. Detaillierte Daten über die Sekundärstruktur, die seit der ersten gelösten Röntgenstruktur zugänglich sind [Adams 1969], belegen, dass Insulin eine, für ein globuläres Protein typische, Verteilung an Sekundärstrukturanteilen aufweist. In Abbildung 2.9 ist die dreidimensionale Struktur eines Insulindimers bei pH 2 in Form eines Bänderdiagramms dargestellt.

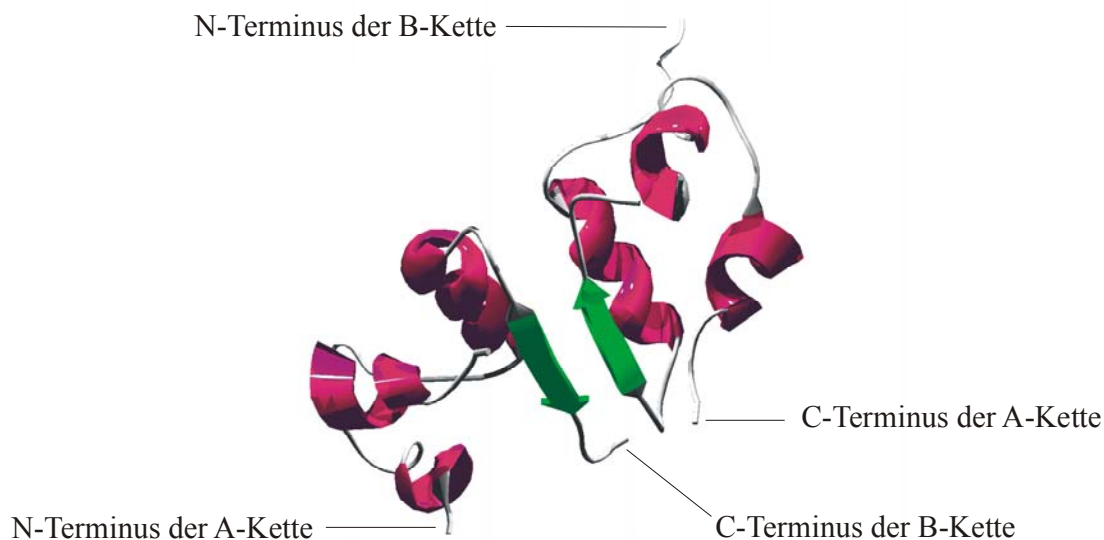


Abbildung 2.9: Bänderdiagramm eines Insulindimers bei pH 2. Das Diagramm wurde mit dem Programm POVRAY, Version 3.6 [POVRAY] unter Zuhilfenahme des Datensatzes 1GUJ [Whittingham 2002] der Brookhaven Proteindatenbank [PDB] erstellt.

Die A-Kette des Insulins ist vorwiegend durch α -helikale Bereiche (A1-A9 und A12-A19) gekennzeichnet, die durch ein kurzes ungeordnetes Segment miteinander verbunden sind. Der N-terminale Bereich der B-Kette beginnt mit einem 8 Aminosäuren umfassenden, ungeordneten Segment, gefolgt von einem α -helikalen-Segment (B9-B19). Dieses geht über eine $\beta(1-4)$ -Schleife in ein äußerst flexibles β -Faltblatt-Segment (B24-B28) über [Derewenda 1989], [Hua 2004]. In dieser Konformation schirmt der C-Terminus der B-Kette die hydrophobe helikale Domäne am N-Terminus der A-Kette von der Umgebung ab.

In Lösung liegt ein komplexes Gleichgewicht zwischen monomeren und höher assoziierten Insulinspezies vor [Jeffrey 1966a], [Jeffrey 1966b], [Strazza 1985]. Die Kontaktfläche zwischen zwei Monomeren wird neben hydrophoben Wechselwirkungen

durch ein antiparalleles β -Faltblatt stabilisiert, an dem jeweils der C-terminale Bereich beider Moleküle beteiligt ist [Blundell 1972]. Das Dimer stellt die Grundeinheit zur weiteren Assoziation bis hin zum Hexamer dar [Cunningham 1955]. Die Lage des Gleichgewichtes zwischen monomerem Insulin und höher assoziierten nativen Oligomeren wird neben der Gesamtkonzentration an Insulin vor allem durch den pH-Wert der Lösung moduliert. Eine Erniedrigung des pH-Wertes resultiert durch den zunehmenden Protonierungsgrad einzelner Seitenketten in einer Zunahme repulsiver elektrostatischer intermolekularer Wechselwirkungen und somit in einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung geringer assoziierter Spezies [Blundell 1972].

Die Fähigkeit zur Assoziation zu höhermolekularen Proteinkomplexen ist nicht nur auf die Bildung nativer Insulinoligomere mit definierter Quartärstruktur beschränkt. Bereits seit der ersten Verwendung von Insulinpräparaten [Banting 1922] wurde beobachtet, dass das Erhitzen von Insulin in saurer Umgebung zu dessen Inaktivierung, verbunden mit einer Präzipitation, führt. Das Präzipitat weist die für Amyloidaggregate charakteristische fibrilläre Morphologie mit hohem cross- β -Anteil auf [Ambrose 1951], [Burke 1972]. Auch andere Faktoren, die native oligomere Insulinassoziate destabilisieren, wie der Kontakt mit hydrophoben Oberflächen [Sluzky 1991] oder die Anwesenheit von Denaturantien [Ahmad 2003], [Ahmad 2004], gehen mit einer beschleunigten Fibrillbildung einher. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Insulinmonomer im Aggregationsprozess eine zentrale Position einnimmt. Es gilt als gesichert, dass sich der Dissoziation nativer Oligomere die teilweise Entfaltung des Monomers, d. h., die Bildung eines aggregationsanfälligen Intermediates, anschließt [Ahmad 2003], [Ahmad 2004], [Nielsen 2001a]. Eine Reihe von experimentellen Beobachtungen gibt Anlass zu der Vermutung, dass in einem solchen Intermediat vormals verborgene hydrophobe Bereiche teilweise exponiert sind [Sluzky 1991], [Sluzky 1992], die Sekundärstruktur jedoch noch weitgehend der des nativen Monomers ähnelt [Bouchard 2000]. Die dem anschließenden Aggregationsprozess zugrunde liegende Kinetik steht im Einklang mit dem Modell eines Keimbildungs-abhängigen Wachstumsmechanismus für die Amyloidbildung [Harper 1997], [Nielsen 2001a]. Als mögliche Aggregationskeime konnten in Lösung nicht-native Oligomere bis hin zu Dodekameren nachgewiesen werden [Nettleton 2000]. Umgebungsabhängige konformelle Unterschiede der Aggregationskeime sind vermutlich verantwortlich für

den beobachteten Polymorphismus von fibrillären Insulinaggregaten, die sich auf alternativen Aggregationspfaden bilden können [Nielsen 2001b] [Jansen 2004], [Jansen 2005], [Dzwolak 2004b]. Abbildung 2.10 gibt daher nur einen zusammenfassenden, stark vereinfachenden Überblick über die Beziehungen zwischen den verschiedenen an der Aggregation beteiligten Spezies.

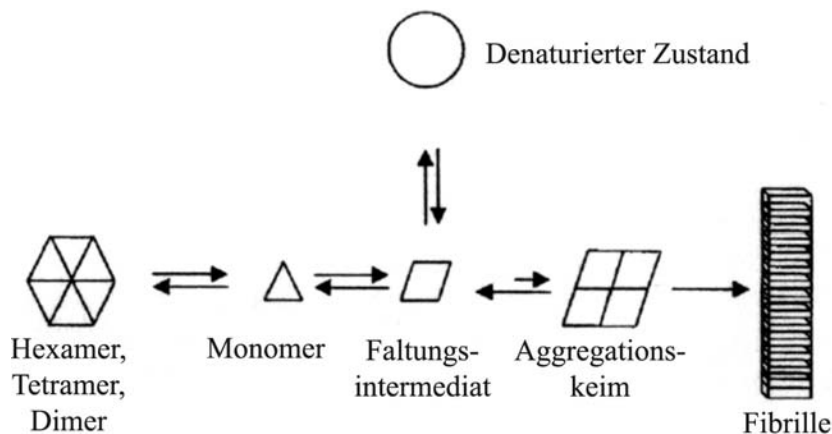


Abbildung 2.10: Schematische, stark vereinfachte Darstellung der Beziehungen zwischen den am Aggregationsprozess von Insulin beteiligten Spezies [Nielsen 2001a].

Vor dem Hintergrund, dass Insulin heutzutage als pharmazeutisches Massenprodukt bei der Behandlung von Diabetespatienten eingesetzt wird, hat das Phänomen der Aggregation auch medizinisch-klinische Relevanz erlangt. Die Bildung von Insulinfibrillen enthaltenden Amyloidablagerungen wurden bei kontinuierlichen subkutanen Insulininfusionen und wiederholten Insulininjektionen beobachtet [Störkel 1983], [Dische 1988], [Swift 2002]. Am problematischsten wirken sich unerwünschte Aggregationsprozesse allerdings in der biotechnologischen Insulinproduktion aus, wo viele Aufreinigungsschritte bei niedrigem pH-Wert eine schnelle Fibrillenbildung begünstigen und somit auch einen zusätzlichen Produktionskostenfaktor darstellen [Brange 1987]. Schließlich fördern auch Agitationsprozesse während des Insulintransports und der Lagerung eine teilweise Aggregation, verbunden mit einer Inaktivierung des Pharmakons. Die detaillierte Aufklärung der Mechanismen, die den einzelnen Entfaltungs- und Aggregationsschritten auf molekularer Ebene zu Grunde liegen, und der äußeren Faktoren, die die einzelnen Schritte beeinflussen, geht daher weit über ein rein grundlagenwissenschaftliches Interesse hinaus.

3 Methodischer Teil

Im Folgenden wird auf die wesentlichen Aspekte der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Untersuchungsmethoden eingegangen.

3.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine der wenigen experimentellen Methoden, mit denen sowohl die Struktur als auch die Dynamik komplexer Moleküle untersucht werden können. Aufgrund ihrer extrem hohen Empfindlichkeit ermöglicht sie die zerstörungsfreie Untersuchung selbst geringster Probenmengen bei einer Zeitauflösung bis in den Nanosekundenbereich.

3.1.1 Elektronische Anregung und Relaxation

Fluoreszenz ist eine Form der Deaktivierung eines elektronisch angeregten Molekülzustandes eines Fluorophors unter Emission von Licht im UV- und sichtbaren Bereich [Lakowicz 1999]. Bei Raumtemperatur liegen die meisten Moleküle gemäß der Boltzmann-Verteilung im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes (Singulett-Zustand $S_0, v=0$) vor. Als Folge der Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge λ kann ein Molekül aus dem elektronischen Grundzustand in den ersten elektronisch angeregten Zustand (Singulett-Zustand S_1) übergehen. Dieser Übergang vollzieht sich nach dem Franck-Condon-Prinzip als vertikaler Übergang im Femtosekundenbereich viel schneller als eine Änderung der Kernabstände. Als Folge dieses Prinzips ist der Übergang in höhere Schwingungsniveaus des elektronisch angeregten Zustandes wahrscheinlicher als in dessen unterstes Schwingungsniveau. Die Rückkehr ins Boltzmann-Gleichgewicht kann unter Abgabe der Überschussenergie auf verschiedenen Wegen erfolgen. Abbildung 3.1 zeigt vereinfacht das Energietermschema (Jablonski-Diagramm) für einige mögliche Relaxationsprozesse.

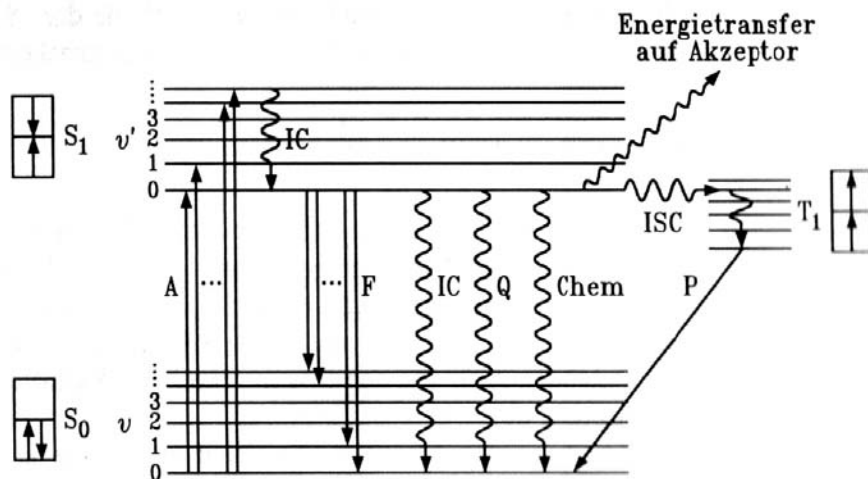


Abbildung 3.1: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm der Relaxationsprozesse eines Fluorophors. Nach Absorption (A) eines Photons kann der Fluorophor einerseits strahlungslos durch innere Umwandlung (IC), Stöße mit umgebenden Molekülen (Q) chemische Reaktion (Chem) oder Energietransfer auf einen Akzeptor vom angeregten (S_1) in den Grundzustand (S_0) relaxieren. Andererseits ist eine Relaxation unter Aussendung von Fluoreszenzstrahlung (F) sowie, nach *intersystem crossing* (ISC) zum ersten angeregten Triplettzustand (T_1), unter Aussenden von Phosphoreszenzstrahlung (P) möglich [Winter 1998].

Aufgrund der geringen Energiedifferenz zwischen den Schwingungsniveaus des angeregten Zustandes relaxiert das Molekül schnell ins unterste Schwingungsniveau ($v' = 0$) des S_1 -Zustandes. Von dort kann eine weitere Energieabgabe strahlungslos durch Verteilung der Überschussenergie auf Schwingungsmoden (innere Umwandlung, *internal conversion*) oder durch Energieübertrag auf andere Moleküle durch Stöße (*Quenching*) erfolgen. Einen weiteren Konkurrenzprozess stellt der strahlungslose Singulett/Singulett-Energietransfer von Überschussenergie eines elektronisch angeregten Fluorophors (Donor) zu einem Fluorophor im Grundzustand (Akzeptor) dar. Ist der Fluorophor im angeregten Zustand reaktiv, so kann die Überschussenergie auch für eine photochemisch induzierte Reaktion genutzt werden.

Den strahlungslosen Relaxationsprozessen stehen zwei Arten von Relaxationsprozessen unter Aussendung elektromagnetischer Strahlung gegenüber. Ausgehend vom S_1 -Zustand kann der Fluorophor in einen energieärmeren Triplett-Zustand (T_1) übergehen und von dort Phosphoreszenzstrahlung aussenden. Dieser Prozess ist mit einer quantenmechanisch verbotenen Spinumkehr durch einen Interkombinationsübergang (*intersystem crossing*, *ISC*) verbunden [Rendell 1987]. Aufgrund der langen

Lebensdauer des Triplettzustandes (meist im Bereich 10^{-2} s – 10^2 s) werden in Lösung alternative Relaxationsmoden allerdings derart begünstigt, dass eine Emission von Phosphoreszenzstrahlung relativ selten beobachtet werden kann [Lakowicz 1999]. Ist schließlich die Energiedifferenz zwischen S_0 - und S_1 -Zustand zu groß, als dass die Überschussenergie allein durch innere Umwandlung abgegeben werden kann, dominiert die Relaxation durch Aussenden von Fluoreszenzstrahlung. Dabei kehrt der Fluorophor, ebenfalls nach dem Franck-Condon-Prinzip, in verschiedene Schwingungsniveaus des S_0 -Zustandes zurück.

Zwar richtet sich das Hauptaugenmerk bei der Anwendung fluoreszenzspektroskopischer Methoden auf die Charakterisierung der emittierten Fluoreszenzstrahlung, doch für eine Interpretation der Ergebnisse in Hinsicht auf Struktur und Dynamik des untersuchten Systems ist eine Berücksichtigung alternativer Relaxationsprozesse unerlässlich. Solche Relaxationsprozesse sind mitverantwortlich für einige der typischer Weise beobachteten Fluoreszenzcharakteristika.

3.1.2 Fluoreszenzcharakteristika

3.1.2.1 Spektren

Der Übergang vom untersten Schwingungsniveau ($v = 0$) des S_0 -Zustandes in Schwingungsniveaus ($v' > 0$) des S_1 -Zustandes erfordert mehr Energie als durch die Relaxation vom untersten Schwingungsniveau ($v' = 0$) des S_1 -Zustandes in verschiedene Schwingungsniveaus ($v > 0$) des S_0 -Zustandes durch Fluoreszenz wieder frei wird. Demzufolge erscheint das Emissionsspektrum gegenüber dem Absorptionsspektrum im Allgemeinen rotverschoben (Stokes-Verschiebung). Das Fluoreszenzspektrum wird jedoch meist noch von der Art des Lösungsmittels beeinflusst. Neben der Spektrenverbreiterung als Folge lokaler Lösungsmittelinhomogenitäten wirken sich vor allem unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen polaren Lösungsmitteln und Fluorophor im Grund- und angeregten Zustand auf die Form und Lage des Emissionsspektrums aus. In einem polaren Lösungsmittel orientieren sich die Lösungsmittelmoleküle bevorzugt antiparallel zum Dipolmoment des Fluorophors, um die Freie Enthalpie zu minimieren. Wenn mit dem Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand eine Änderung der

Stärke und Orientierung des Fluorophor-Dipolmomentes verbunden ist, orientieren sich die Lösungsmittelmoleküle im angeregten Zustand durch Rotation um. Geschieht dies innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer von etwa 10^{-8} s, so wird der S_1 -Zustand energetisch abgesenkt. Die anschließende Relaxation des Fluorophors in den S_0 -Zustand erfolgt innerhalb 10^{-15} s so schnell, dass sich innerhalb dieser Zeit die Lösungsmitteldipole nicht erneut umorientieren können. Der Fluorophor erreicht damit einen Zustand, der energetisch etwas ungünstiger als der S_0 -Gleichgewichtszustand liegt (Abbildung. 3.2a). Die damit verbundene zusätzliche Rotverschiebung des Spektrums wächst im Allgemeinen mit der Polarität des Lösungsmittels (Abbildung 3.2.b).

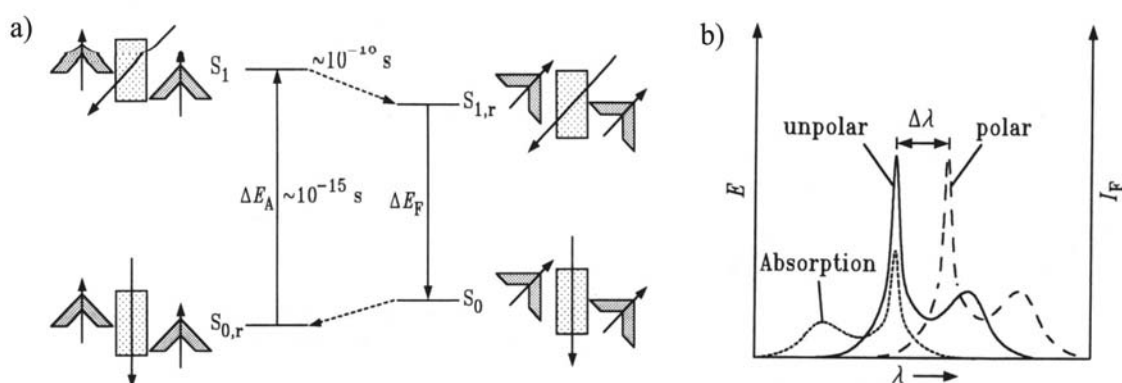


Abbildung 3.2: Zustandekommen der Rotverschiebung des Emissionsspektrums in einem polaren Lösungsmittel. a) Darstellung der energetischen Verhältnisse bei Wechselwirkung zwischen Fluorophor- und Lösungsmitteldipolmoment im Nichtgleichgewichts- und Gleichgewichts- (r)-Zustand; b) Verschiebung des Emissionsmaximums um $\Delta\lambda$ zu größeren Wellenlängen in polaren Lösungsmitteln [Winter 1998].

Veränderungen in der lokalen Umgebung eines Fluorophors bewirken im Allgemeinen neben der Verschiebung der Lage seiner Emissionsbande auch eine Veränderung der Bandenintensität, indem sie die Balance zwischen Fluoreszenz und alternativen strahlungslosen Deaktivierungsprozessen beeinflussen. Als Maß für die Effektivität strahlungsaktiver Deaktivierungsprozesse kann die zur Intensität proportionale Fluoreszenzquantenausbeute Φ als Verhältnis zwischen den vom Fluorophor emittierten Photonen und den absorbierten Photonen herangezogen werden. Die Quantenausbeute steht in direkter Beziehung zu den Geschwindigkeitskonstanten k_i der Prozesse, die die Depopulation des angeregten Zustandes bewirken [Lakowicz 1999]:

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + \sum_i k_i} \quad (3.1)$$

Hierbei sind k_f und k_i die Geschwindigkeitskonstanten für die Fluoreszenzrelaxation bzw. die Relaxation durch konkurrierende Prozesse.

Über diese Geschwindigkeitskonstanten ist zudem auch die Fluoreszenzlebensdauer τ_f definiert, die die durchschnittliche Verweilzeit eines Fluorophors im angeregten Zustand widerspiegelt:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + \sum_i k_i} \quad (3.2)$$

3.1.2.2 Fluoreszenzdepolarisation

Ein weiteres Charakteristikum des Fluoreszenzprozesses äußert sich in der Eigenschaft, nach Absorption linear polarisierter Strahlung diese durch Re-Emission in einem spezifischen Ausmaß zu depolarisieren. Zur Ermittlung des Polarisationsgrades bzw. der Anisotropie der emittierten Strahlung durchläuft die in der Regel unpolarisierte Anregungsstrahlung einen Polarisator, wodurch nur der Teil der Anregungsstrahlung auf die Probe gelangt, dessen elektrischer Feldvektor in einer festen Orientierung zur Ausbreitungsrichtung oszilliert. Detektiert wird senkrecht zur Einstrahlungsrichtung die Intensität der beiden vom Fluorophor emittierten Komponenten, deren Polarisations Ebenen parallel und senkrecht relativ zu der der Anregungsstrahlung ausgerichtet sind (I_{\parallel} und I_{\perp}). Aus den gemessenen Emissionsintensitätskomponenten wird die Polarisation P bzw. die Anisotropie r folgendermaßen berechnet:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}; \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3.3)$$

Zwischen beiden Größen besteht folgender Zusammenhang:

$$r = \frac{2}{3} \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right)^{-1} \quad (3.4)$$

Es kann gezeigt werden, dass in isotropen Medien, wie sie z. B. wässrige Lösungen darstellen, die Anisotropie maximal den Wert der Grenzanisotropie, r_0 , annehmen kann [Lakowicz 1999]. Diese molekülspezifische Größe erfasst, unabhängig von der Umgebung des Fluorophors, die intrinsische Fluoreszenzdepolarisation. Neben intrinsischen Depolarisationsfaktoren beeinflusst aber auch die Rotationsdynamik des Fluorophors das Ausmaß der experimentell beobachtbaren Anisotropie. Aufgrund der Rotation des Fluorophors während der Fluoreszenzlebensdauer τ_f ändert sich seine Orientierung relativ zur Polarisationssebene der Anregungsstrahlung. Ist der Fluorophor Teil eines größeren Molekülverbandes, so kann eine solche Orientierungsänderung sowohl durch die globale Rotationsbewegung des gesamten Moleküls als auch durch eine lokale Segmentmobilität hervorgerufen werden. Im einfachsten Modell der ungehinderten, isotropen Rotationsbewegung eines kugelförmigen Moleküls gilt nach Perrin folgende Gleichung für den zeitlichen Mittelwert der Anisotropie [Lakowicz 1999]:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau_f}{\tau_{\text{rot}}} \right) \quad (3.5)$$

Die Rotationskorrelationszeit τ_{rot} als Maß für die Rotationsdynamik eines Moleküls ist definiert als die Zeit, die das Molekül zur Rotation um ein Radian benötigt. Sie lässt sich aus hydrodynamischen Daten des Moleküls näherungsweise berechnen [Lakowicz 1999]:

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{\eta V_h}{k_B T} \quad (3.6)$$

Hierbei sind η die Viskosität des Lösungsmittels, V_h das hydrodynamische Molekülvolumen, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur.

Nach Gleichung (3.5) ist das Verhältnis zwischen Fluoreszenzlebensdauer und Rotationskorrelationszeit des Moleküls das entscheidende Kriterium für das Ausmaß der Fluoreszenzdepolarisation infolge der Fluorophorrotation. Bei konstanter Fluoreszenzlebensdauer wird demnach die beobachtbare Anisotropie umso größer, je langsamer die Rotation des gesamten Moleküls erfolgt. Diese Tatsache wird im Rahmen der Untersuchung von Proteinaggregations- und Assoziationsprozessen ausgenutzt, bei denen sich die Bildung von Molekülassoziaten in einer deutlichen Volumenzunahme und damit, nach Gleichung (3.6), in einer Zunahme der Rotationskorrelationszeit niederschlägt [Paladini 1981a], [Prevelige 1994].

3.1.3 Verwendete Fluorophore

Thioflavin T (ThT)

Thioflavin T (ThT), dessen Strukturformel in Abbildung 3.3 dargestellt ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als extrinsischer, nicht-kovalent gebundener Fluorophor zur Untersuchung der Aggregationskinetik von Insulin eingesetzt.

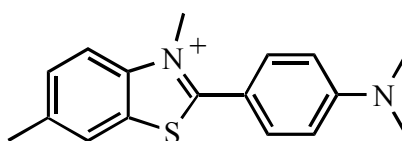


Abbildung 3.3: Strukturformel von Thioflavin T.

Seit seiner Einführung 1959 in der medizinischen Diagnostik wurde ThT u.a. zur Charakterisierung pathologischer Amyloidablagerungen [Vassar 1959], [Kelényi 1967], zur Quantifizierung *in vitro* gebildeter Amyloidfibrillen und zur Analyse der Fibrillbildungskinetik einer Reihe amyloidogener Proteine *in situ* verwendet [Naiki 1989], [LeVine III 1993], [LeVine III 1995]. Der weitverbreitete Einsatz von ThT beruht vor allem auf der hohen Sensitivität des Fluorophors für fibrilläre Aggregate: In Wasser weist ThT eine vernachlässigbare Fluoreszenz auf, wohingegen in Anwesenheit fibrillärer Aggregate bei Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ in der Regel eine Zunahme der Emissionsintensität bei $\lambda_{\text{em}} = 482 \text{ nm}$ um 2-3 Größenordnungen beobachtet wird [LeVine III 1993]. Die geringe Quantenausbeute des freien Fluorophors wird der Rotation des Benzamid-Ringes relativ zum Benzothiazol-Ringsystem im elektronisch angeregten Zustand zugeschrieben, was zu einer Verkleinerung des delokalisierten π -

Elektronensystems führt [Voropai 2003]. Die drastische Erhöhung der Quantenausbeute von ThT infolge der Bindung an Amyloidfibrillen scheint im Wesentlichen auf einer eingeschränkten Rotationsrelaxation des Fluorophors im elektronisch angeregten Zustand zu basieren [Friedhoff 1998], [Voropai 2003].

ThT gilt als amyloidspezifischer Fluoreszenzmarker, da in Anwesenheit nativer, teilweise oder vollständig entfalteter Proteine kein Anstieg der Emissionsintensität beobachtet wird [LeVine III 1995], [Voropai 2003]. Elastinfibrillen, Polysaccharide und DNA zeigen allerdings ebenfalls eine ThT-positive Fluoreszenzantwort [Vassar 1959], [Kelényi 1967]. Auch wurde in einigen Untersuchungen eine erhöhte ThT-Fluoreszenz in Anwesenheit amorpher Aggregate sowie oligomerer Fibrillvorläufer nachgewiesen [Carrotta 2001], [Kenig 2004], [Lindgren 2005], weshalb die molekulare Erkennung des cross- β -Musters vollständig ausgebildeter Amyloidfibrillen als spezifisches Bindungsmotiv für den Fluorophor in Frage gestellt wird [Khurana 2005]. Jedoch ist der detaillierte Bindungsmechanismus weiterhin unaufgeklärt. Sowohl hydrophobe Wechselwirkungen als auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und die Ausbildung von Ionenpaaren zwischen dem Thiazol-Stickstoff des ThT und negativ geladenen Fibrillbereichen werden als mögliche Wechselwirkungsarten diskutiert [Kelényi 1967], [LeVine III 1995], [Krebs 2005], [Khurana 2005].

Alexa 488

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Untersuchungen der statischen Fluoreszenzanisotropie unter Einsatz des Fluorophors Alexa 488 durchgeführt, dessen Strukturformel in Abbildung 3.4 dargestellt ist. Alexa 488 kann in Form eines Succimidylesters selektiv mit primären neutralen Aminogruppen zu stabilen aliphatischen Amiden gekoppelt und so kovalent an ein Protein gebunden werden. Die resultierenden Konjugate zeichnen sich auch bei niedrigen pH-Werten durch eine hohe Emissionsintensität, bedingt durch ihren großen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{494 \text{ nm}} = 71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und eine hohe Quantenausbeute, aus und sind in dieser Hinsicht den oftmals standardmäßig verwendeten Fluoresceinderivaten überlegen [Panchuk-Voloshina 1999].

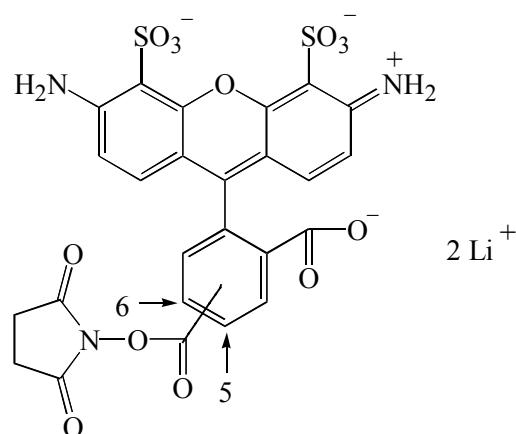


Abbildung 3.4: Strukturformel des Lithiumsalzes des Alexa 488-Succinimidylesters.

Das Absorptionsmaximum der Konjugate liegt bei ungefähr 494 nm, das Emissionsmaximum bei ungefähr 519 nm [Molecular Probes]. Die hohe Emissionsintensität der Konjugate ist bei der Untersuchung von Proteinaggregationsprozessen förderlich, da nur ein kleiner Teil der Proteinmoleküle markiert werden muss, um ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Somit können mögliche Einflüsse des Fluoreszenzmarkers auf den Aggregationsprozess minimiert werden. Die Tatsache, dass der Alexa 488-Fluorophor sulfoniert und somit in wasserlöslicher Form vorliegt, verringert einerseits die bei der Konjugation von Proteinen mit hydrophoben Farbstoffen vielfach beobachtete Tendenz zur unerwünschten Aggregation [Brinkley 1992]. Andererseits kann dadurch auf die Verwendung organischer Cosolventien beim Markierungsprozess verzichtet werden. Ein weiteres positives Charakteristikum des Alexa 488-Fluorophors ist in seiner über die gesamte Absorptionsbande konstant hohen Grenzanisotropie von $r_0 = 0,376$ zu sehen [Rusinova 2002]. Dieser hohe Wert maximiert die Möglichkeit, Veränderungen der Anisotropie zu beobachten, die aus Proteinassoziations- und -aggregationsprozessen resultieren.

3.2 Circular dichroism spectroscopy (CD-Spektroskopie)

3.2.1 Grundlagen

Die CD-Spektroskopie stellt eine der wichtigsten spektroskopischen Methoden dar, um optisch aktive Substanzen in Lösung hinsichtlich ihrer Konfiguration bzw. Konformation zu untersuchen. Als optisch aktive Substanzen, die im bei der CD-

Spektroskopie verwendeten UV/Vis-Bereich Strahlung absorbieren, kommen inhärent chirale Chromophore oder achirale Chromophore in chiraler Umgebung in Betracht. Deren Eigenschaft, links- und rechtszirkular polarisierte Strahlung unterschiedlich stark zu absorbieren, wird als Circular dichroismus bezeichnet. Die Superposition der elektrischen Feldvektoren der transmittierten links- und rechtszirkular polarisierten Strahlung, \vec{E}_L und \vec{E}_R , liefert Strahlung, deren elektrischer Feldvektor \vec{E} senkrecht zur Ausbreitungsrichtung eine Ellipse beschreibt (Abbildung 3.5).

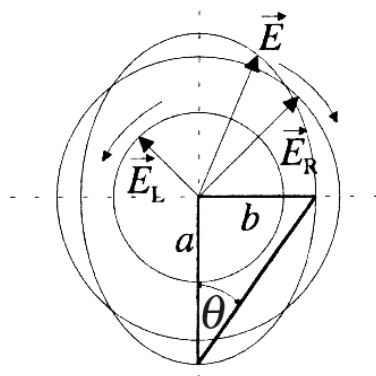


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Zustandekommens elliptisch polarisierter Strahlung durch Superposition links- und rechtszirkular polarisierter Strahlung unterschiedlicher Intensität.

Über das Verhältnis der beiden Hauptachsen, a und b , der Ellipse ist die Elliptizität θ folgendermaßen definiert:

$$\theta = \arctan \frac{b}{a} \quad (3.7)$$

In der Praxis werden die Intensitäten, I_L und I_R , der entgegengesetzt zirkular polarisierten Lichtwellen nach Absorption durch die optisch aktive Probe gemessen, so dass für die Elliptizität gilt:

$$\theta = \arctan \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L} \quad (3.8)$$

Für kleine Elliptizitäten erhält man unter Berücksichtigung der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten ε gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetzes näherungsweise folgenden Zusammenhang:

$$\theta = \ln 10 \cdot \frac{180^\circ}{4\pi} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (3.9)$$

Hierbei sind c und d die Konzentration und die Durchstrahlstärke der Probe.

3.2.2 CD-Spektroskopie zur Untersuchung von Proteinen

Proteine weisen in der Regel einen ausgeprägten Circular dichroismus im UV-Bereich des Strahlungsspektrums auf. Das CD-Spektrum im fernen UV-Bereich (≈ 180 - 250 nm) resultiert aus elektronischen Übergängen innerhalb der Peptidgruppen des Proteinrückgrates. Aufgrund der orientierungs- und damit konformationsabhängigen Wechselwirkung der Chromophor-Übergangsdipolmomente weisen die CD-Spektren von Proteinen im fernen UV-Bereich eine für die jeweilige Sekundärstruktur-Zusammensetzung charakteristische Gestalt auf. In Abbildung 3.6 sind schematisch typische CD-Spektren reiner Sekundärstrukturelemente dargestellt.

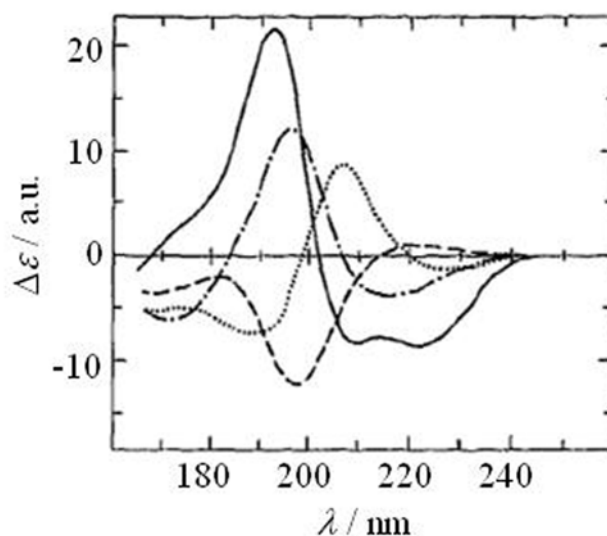


Abbildung 3.6: Typische CD-Spektren im fernen UV für α -Helix (durchgängige Linie), β -Faltblatt (Striche und Punkte), Schleife (punktierte Linie) und Zufallsknäuel (gestrichelte Linie). Die Abbildung wurde modifiziert nach [Brahms 1980].

Im Rahmen der Untersuchung von Proteinaggregationsprozessen erlauben vor allem die Unterschiede der CD-Spektren für α -Helix und β -Faltblatt in der Regel eine qualitative Beschreibung des Aggregationsfortschrittes, da dieser häufig mit einem Verlust nativer α -helikaler Bereiche zu Gunsten intermolekularer β -Faltblattstrukturen einhergeht. Eine quantitative Analyse der CD-Spektren von Proteinen im fernen UV zielt darüber hinaus

oftmals auf die Ermittlung der relativen Anteile der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente. Dazu wird im Allgemeinen das gemessene, normierte CD-Spektrum als Linearkombination von normierten Spektren reiner Sekundärstrukturelemente dargestellt und deren jeweiliger relativer Anteil nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt [Greenfield 1996]. Alternativ zur Verwendung eines Satzes von Referenzspektren für die reinen Sekundärstrukturelemente, z.B. von Brahm *et al.* [Brahm 1980] oder Reed *et al.* [Reed 1997], können die CD-Spektren im fernen UV auch nach einem von Perczel *et al.* entwickelten Algorithmus analysiert werden, bei dem keine *a priori*-Annahmen über die Form der Spektren für die reinen Sekundärstrukturkomponenten erforderlich ist [Perczel 1991], [Perczel 1992]. Bemerkenswerter Weise weisen die so ermittelten Komponenten ein großes Maß an Übereinstimmung mit experimentell gemessenen Spektren für die reinen Sekundärstrukturelemente auf.

Im Wellenlängenbereich des nahen UV ($\approx 250\text{-}350\text{ nm}$) resultiert der Circular dichroismus von Proteinen zum Großteil aus elektronischen Übergängen innerhalb der aromatischen Aminosäureseitenketten. Im nativen Zustand eines Proteins befindet sich jede dieser Seitenketten in unterschiedlicher asymmetrischer Umgebung, so dass aufgrund dieser Umgebungschiralität dem inhärenten Circular dichroismus der einzelnen Chromophore zusätzlich ein induzierter Beitrag überlagert ist. Daher kann das CD-Spektrum von Proteinen im nahen UV als charakteristischer Fingerabdruck der jeweiligen Tertiär- bzw. Quartärstruktur interpretiert werden [Kelly 2000].

3.3 Absorptionsspektroskopie

3.3.1 Grundlagen

Die Absorptionsspektroskopie stellt eine der am weitesten verbreiteten biophysikalisch-chemischen Analysemethoden dar, mit deren Hilfe die Konzentration von Biomolekülen – zumeist im UV/Vis-Bereich – ermittelt werden kann. Der quantitative Zusammenhang zwischen der gemessenen Extinktion E der Probe und der Konzentration c des Analyten wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.10)$$

Hierbei ist d die Durchstrahlstärke der Probe und ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient.

3.3.2 1-Anilino-8-naphthalinsulfonsäure (ANS)

ANS, dessen Strukturformel in Abbildung 3.7 dargestellt ist, wird aufgrund der starken Abhängigkeit der Lage seines Emissionsmaximums sowie seiner Quantenausbeute von der Polarität seiner Mikroumgebung überwiegend zur fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung von Proteinkonformationen eingesetzt [Slavik 1982].

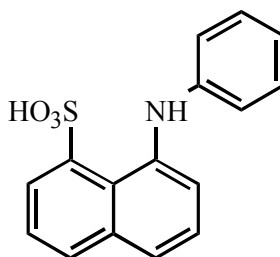


Abbildung 3.7: Strukturformel von ANS.

Die Wechselwirkung von ANS mit Faltungsintermediaten, wie sie bei der Denaturierung einer Reihe von Proteinen beobachtet werden [Semisotnov 1991], [Engelhard 1995], ruft häufig eine signifikante Erhöhung der Quantenausbeute des Fluorophors hervor. Darüber hinaus wurde die charakteristische ANS-Fluoreszenz auch in Gegenwart oligomerer Fibrillorstufen und vollständig ausgebildeter Amyloidfibrillen beobachtet [Serio 1999], [Lindgren 2005]. In der Regel wird die Beobachtung der Fluoreszenzzunahme von ANS in Gegenwart bestimmter Proteinkonformationen synonym für das Vorhandensein exponierter, hydrophober Bindungsstellen für ANS verwendet. Die Affinität der hydrophoben Naphthalin-Einheit für hydrophobe Proteinbereiche scheint allerdings für die Stärke der Wechselwirkung zwischen ANS und exponierten Proteinsegmenten gegenüber elektrostatischen Wechselwirkungen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte positive Nettoladung von Proteinen infolge einer Erniedrigung des pH-Wertes mit einer Zunahme an ANS-Bindungsstellen korreliert [Matulis 1998].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde - unabhängig von der Art der Wechselwirkungen - das Bindungsverhalten verschiedener Insulinaggregate gegenüber ANS alternativ absorptionsspektroskopisch quantifiziert. Aus einem Vergleich der UV-Absorption von ANS vor der Inkubation mit weitgehend unlöslichem Proteinaggregat mit der Absorption im Überstand nach der Inkubation kann unter Verwendung von Gleichung (3.10) der Anteil von gebundenem ANS direkt ermittelt werden.

3.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die Differential Scanning Calorimetry (DSC) stellt die wichtigste Methode zur quantitativen kalorimetrischen Untersuchung von Biomolekülen dar, mit deren Hilfe thermodynamische Informationen, z.B. über Proteinfaltungs- und -aggregationsprozesse oder Phasenumwandlungen von Lipiden, erhalten werden können. Im Folgenden wird die Methode kurz skizziert [Winter 1998].

Das Messprinzip der DSC beruht, ausgehend vom thermischen Gleichgewicht, auf der simultanen Erwärmung von zu untersuchender Probe (P) und einer entsprechenden Referenz (R, z. B. Pufferlösung) mit konstanter Heizrate β . Probe und Referenz befinden sich jeweils in gleichartigen, separat temperierbaren, thermisch isolierten Behältnissen bei derselben Temperatur. Findet in der Probe während des Heizvorganges, z.B., eine Phasenumwandlung statt, muss die Heizleistung P für die Probe (P_P) von der für die Referenz (P_R) unterschiedlich sein, um das thermische Gleichgewicht zwischen beiden zu gewährleisten. Die primäre Messgröße der DSC ist dabei die Differenz der Heizleistungen, $\Delta P = P_P - P_R$. Diese Differenz ist proportional zum Unterschied der Wärmekapazitäten, $\Delta C(T)$, von Probe und Referenz:

$$\Delta C(T) = \frac{\Delta P(T)}{\beta} \quad (3.11)$$

Bei der Auftragung von ΔP gegen T lässt sich aus DSC-Thermogrammen bei konstantem β die Differenz der Wärmekapazitäten zwischen Probe und Referenz und schließlich die Enthalpieänderung für die Phasenumwandlung der Probe ermitteln. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die DSC-Thermogramme halbquantitativ zur Ermittlung der Hauptübergangstemperatur, T_m , und der Breite des Phasenüberganges,

FWHH, bei der Gel-Fluid-Umwandlung von DSPC-Vesikeln in verschiedenen Puffersystemen ausgewertet.

4 Experimenteller Teil

4.1 Probenpräparation

4.1.1 Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Chemikalie	Bezugsquelle
Insulin aus Rinderpankreas, 24,8 units/mg, Zn ²⁺ -Gehalt \approx 0,5	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Ethanol (EtOH)	Sigma, Taufkirchen
2,2,2-Trifluorethanol (TFE)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure (HAc)	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Alexa 488-Succimidylester, Dilithiumsalz	MoBiTec, Göttingen
Alexa 488-C ₅ -Maleinimid	MoBiTec, Göttingen
Thioflavin T (ThT)	Merck, Darmstadt
1-Anilino-8-naphthalinsulfonsäure (ANS)	MoBiTec, Göttingen
Bio-Gel P-30	Bio-Rad, Hercules, USA
kolloides SiO ₂ LUDOX [®] , 30% in H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
Chloroform (CHCl ₃)	Merck, Darmstadt

Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Distearoylphosphatidylcholin (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dioleoylphosphatidylserin (DOPS)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

4.1.2 Präparation von Insulinlösungen ohne extrinsische Fluorophore

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Insulinlösungen ohne extrinsische Fluorophore folgendermaßen präpariert: Rinderinsulin wurde direkt in bidest. H₂O (ggf. 0,1 M NaCl enthaltend) bzw. der entsprechenden Cosolvens-haltigen Lösung suspendiert und mit 1 M HCl-Lösung auf pH 1,9 eingestellt (Portamess[®] 912 pH-Meter von Knick, Dülmen). Die Einwaagekonzentration der Lösungen wurde am UV/Vis-Spektrometer Lambda 25 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) durch Absorptionsmessungen unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten, $\epsilon = 6080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Insulin, bei einer Wellenlänge $\lambda = 278 \text{ nm}$ kontrolliert [Weil 1965]. Für die UV-spektrometrischen Messungen wurden Küvetten aus Quarzglas (Hellma, Müllheim) mit Schichtdicken von 2 mm und 10 mm verwendet.

4.1.3 Markierung von Insulin mit Alexa 488

Die Markierung von Insulin mit dem Succimidylester von Alexa 488 entspricht mechanistisch einer nukleophilen Substitution mit einem primären Amin (Abbildung 4.1).

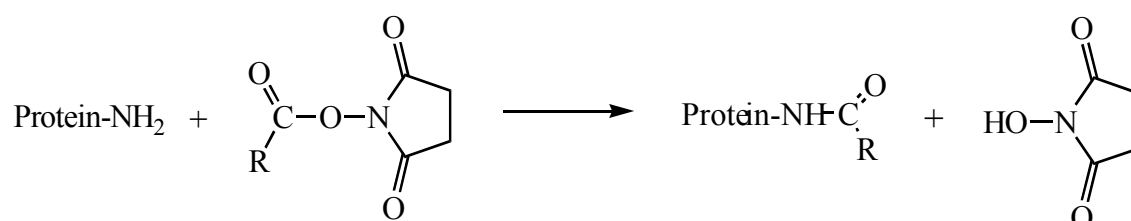


Abbildung 4.1: Reaktionsgleichung für die Reaktion einer primären Aminogruppe eines Proteins mit dem Succimidylester des Alexa 488-Fluorophors (R).

Als geeignete Nukleophile kommen im Falle von Proteinen die ε -NH₂-Gruppe von Lysinseitenketten und die α -NH₂-Gruppe freier N-Termini in Betracht, die allerdings nur in ihrer neutralen Form reaktiv sind. Eine optimale Reaktivität erlangen diese basischen Gruppen bei pH 8,2-8,5 [Brinkley 1992]. Bei diesem pH-Wert löst sich Insulin nur sehr langsam in Wasser. Zur Beschleunigung des Auflösungs Vorgangs wurde Insulin zu ≈ 2 Gew.% in bidest. H₂O suspendiert, unter Zugabe von 1 M HCl gelöst und UV-spektrometrisch die Konzentration ermittelt. Diese Stammlösung wurde mit 0,1 M NaHCO₃-Lösung auf 684 μ M verdünnt und mit 0,5 M NaOH auf pH 8,3 eingestellt. 500 μ l dieser Lösung ($1,7 \cdot 10^{-7}$ mol Insulin) wurden zu einem gebrauchsfertigen Aliquot (110 μ g, entsprechend $3,4 \cdot 10^{-7}$ mol) des Dilithiumsalzes des Alexa 488-Succimidylesters gegeben, was einem Stoffmengenverhältnis Insulin:Farbstoff = 2:1 entspricht. Die Reaktionslösung wurde mit Hilfe eines Rührfisches zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei $\vartheta = 10$ °C gerührt. Die Reinigung des markierten Proteins mittels Größenausschlusschromatographie erfolgte über eine mit Bio-Gel P30 beladene Säule (Länge: 30 cm; Durchmesser: 7 mm) durch Elution mit 0,1 M NaHCO₃-Lösung, pH 8,3. Die erste der beiden farbigen Fraktionen wurde für die UV/VIS-spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration, c_{Protein} , und des Markierungsgrades m verwendet. Dazu muss der Beitrag des extrinsischen Fluorophors zur Gesamtabsorption A berücksichtigt werden [Brinkley 1992]:

$$c_{\text{Protein}} = \frac{[A(\lambda_1) - [f \cdot A(\lambda_2)]]}{d \cdot \varepsilon_{\text{Protein}}(\lambda_1)} \quad (4.1)$$

Dabei ist λ_1 die Wellenlänge des Absorptionsmaximums für das unmarkierte Protein, λ_2 die Wellenlänge des Absorptionsmaximums für den extrinsischen Fluorophor und d die Schichtdicke der Küvette. f ist der Bruchteil der Maximalabsorption $A(\lambda_2)$ des extrinsischen Fluorophors, der bei λ_1 beobachtet wird. Bei einer Wellenlänge $\lambda_1 = 280$ nm ist $\varepsilon_{\text{Insulin}} = 5530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [Sluzky 1991]. Der Anteil der Absorption von Alexa 488 bei dieser Wellenlänge beträgt $f = 0,11$ der Maximalabsorption bei $\lambda_2 = 494$ nm [Molecular Probes 2001].

Der Markierungsgrad m ist definiert als die Stoffmenge gebundenen Fluorophors pro Stoffmenge des Proteins und lässt sich wie folgt berechnen [Brinkley]:

$$m = \frac{A(\lambda_2)}{\varepsilon_{\text{Fluorophor}}(\lambda_2) \cdot c_{\text{Protein}}} \quad (4.2)$$

Für Alexa 488 wird $\varepsilon(494 \text{ nm}) = 71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ als Richtwert für Proteinkonjugate angegeben [Molecular Probes 2001]. Zur Ermittlung von $A(\lambda_1)$ und $A(\lambda_2)$ wurden UV/Vis-Spektren im Spektralbereich zwischen $\lambda = 200 \text{ nm}$ und $\lambda = 600 \text{ nm}$ mit einer Schrittweite von $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$ bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 240 nm/min aufgenommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das zur Markierung eingesetzte Insulin zu 80-95% wiedergewonnen. Die Konjugate wiesen im Mittel einen Markierungsgrad von 1:20 bis 1:25 auf. Die markierten Proteinlösungen wurden nach Aliquotierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur Herstellung von Proteinlösungen von 0,02-0,5 Gew.% für die Fluoreszenzanisotropie-Untersuchungen wurde nicht-markiertes Insulin mit dem entsprechenden Volumen der Stammlösung markierten Insulins versetzt, so dass ein Markierungsgrad von etwa 1:1000 erhalten wurde. Diese Ansätze wurden in wässriger 0.1 M NaCl bzw. der entsprechenden Cosolvens-haltigen Lösung suspendiert und mit 1 M HCl auf pH 1,9 eingestellt.

4.1.4 Präparation von Insulinproben für den ThT-Assay

Mit Ausnahme der Proben für die Messungen in Anwesenheit von unilamellaren Lipidvesikeln wurden 0,5-gewichtsprozentige Insulinlösungen durch Zugabe von $\approx 4 \text{ mM}$ ThT-Stammlösung in bidest. H_2O zu nicht markiertem Insulin hergestellt. Diese Ansätze wurden in bidest. H_2O (mit und ohne 0.1 M NaCl; siehe detaillierte Angaben zu den einzelnen Messreihen) bzw. der entsprechenden Cosolvens-haltigen Lösung suspendiert und mit 1 M HCl auf pH 1,9 eingestellt, so dass das Verhältnis ThT:Insulin ca. 1:50 (mol/mol) betrug.

Für die Messungen in Anwesenheit von Lipidvesikeln wurden zunächst 1-gewichtsprozentige, 1:5 (mol/mol) ThT-haltige Insulinlösungen durch Lösen des

Insulins und der ThT-Stammlösung in 10 mM HCl bzw. H_3PO_4 hergestellt. Nach 1:10-Verdünnung der Lösungen mit bidest. H_2O bzw. 10 mM Na-Phosphatpuffer wurde der pH-Wert mit ca. 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf 1,9 bzw. 7,4 eingestellt. Zur Untersuchung des Einflusses von Ladungsabschirmung wurden die gleichen Proben auch bei Anwesenheit von jeweils 0,1 M NaCl in den entsprechenden Lösungsmitteln präpariert. Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Proben abschließend 1:1 (Vol./Vol.) mit den Vesikelpräparationen unter den jeweils entsprechenden Lösungsmittelbedingungen gemischt (siehe Kapitel 4.1.6).

4.1.5 Präparation von Insulinproben für die ANS-Titration

2 ml von Proben mit 0,1 Gew.% Insulin in Wasser sowie in je 20 Gew.% EtOH, TFE bzw. Glycerol und je 0,1 M NaCl bei pH 1,9 wurden zur vollständigen Aggregation für 4 Tage bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Entfernung der Cosolventien, die mit der späteren ANS-Bindung der Aggregate interferieren könnten, wurden die Proben anschließend für 30 min bei 15000 U/min in einer MIKRO 20 Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert und die Präzipitate in 2 ml 0,1 M NaCl, pH 1,9 resuspendiert. Aus dem Vergleich der UV-Absorption bei 278 nm im Überstand des Zentrifugats mit der Absorption in der entsprechenden Probe vor der Aggregation konnte auf > 99% Aggregation der inkubierten Proben geschlossen werden. Je 50 μl der resuspendierten Proben wurden mit 2 mM bzw. 0,5 mM ANS-Stammlösung in 0,1 M NaCl, pH 1,9 auf 1:10 verdünnt, so dass je 500 μl 17,7 μM Insulin und ANS-Konzentrationen zwischen 2 μM und 750 μM resultierten. Nach 24 h Inkubation der ANS-haltigen Proben bei Raumtemperatur und 200 U/min auf einem 3005-Kreisschüttler der Firma GFL (Burgwedel) wurden diese erneut für 30 min bei 15000 U/min zentrifugiert und die ANS-Konzentration im Überstand UV-spektrometrisch ermittelt. Zusätzlich wurde die Insulinkonzentration im Überstand von entsprechenden Kontrollproben ohne ANS ermittelt, wobei keine Resolubilisierung der ursprünglichen Aggregate durch Wechsel des Suspensionsmediums und Verdünnung festgestellt werden konnte (keine UV-Absorption bei 278 nm).

4.1.6 Präparation unilamellarer Vesikel

Der Einfluss von Modellbiomembranen auf die Aggregationskinetik von Insulin mit Hilfe des ThT-Assays wurde an folgenden Lipidsystemen untersucht: DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, DOPC / DOPS- sowie DOPC / DOPE-Mischungen mit bis zu 50 mol% DOPS bzw. DOPE.

Von den Lipiden wurden Stammlösungen zu je 10 mg/ml in Chloroform (für DOPS: Chloroform/Methanol 19:1 (Vol./Vol.)) hergestellt, jeweils im oben angegebenen Verhältnis in Eppendorf-Gefäßen gemischt und im Stickstoffstrom eingengt. Das restliche Chloroform wurde über Nacht in der SpeedVac (Savant Instruments, Holbrook, USA) bei 0,1 mbar entfernt. Die getrockneten Lipidfilme wurden in HCl, pH 1,9 bzw. 10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,4 (jeweils mit und ohne 0,1 M NaCl) rehydratisiert, so dass die Präparationen nominal eine Gesamtlipidkonzentration von 1,72 mM aufwiesen. Zur Gewährleistung einer homogenen Hydratisierung der Lipide wurden fünf Freeze-Thaw-Vortex-Zyklen durchgeführt. Dabei wurden die Lipiddispersionen wiederholt abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Temperierbad auf eine Temperatur erwärmt, bei der sich die Lipide im flüssig-kristallinen Zustand befinden. Große unilamellare Vesikel wurden anschließend nach der Methode der Extrusion mit Hilfe eines Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) hergestellt [MacDonald 1991], wobei die Proben wechselseitig 21-mal im flüssig-kristallinen Zustand durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm nominalem Porendurchmesser gepresst wurden. Abschließend wurden die extrudierten Proben für die Fluoreszenzuntersuchungen 1:1 (Vol./Vol.) mit den entsprechenden Insulin / ThT-haltigen Lösungen gemischt und sofort für die Fluoreszenzmessungen verwendet.

4.2 Fluoreszenzspektroskopie

4.2.1 Instrumentelles

Das Fluoreszenzspektrometer K2

Sämtliche fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden am Multifrequenz Phasen- und Modulationsspektrometer vom Typ K2 der Firma ISS, Inc. (Urbana, USA) durchgeführt, dessen Strahlengang in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt ist.

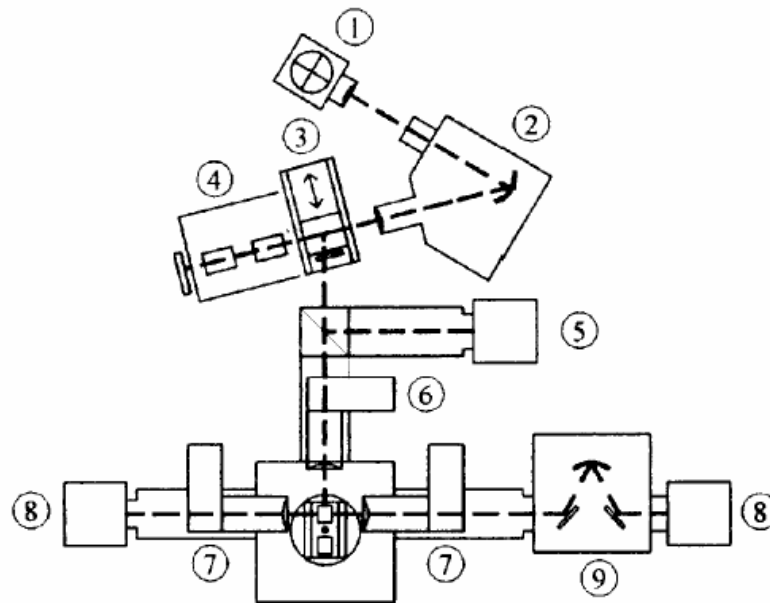


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Fluoreszenzspektrometer K2. 1: Xenon-Bogenlampe; 2: Anregungsmonochromator; 3: 2-Wege-Polarisator; 4: Pockels-Zelle; 5: Referenzdetektor; 6: Anregungspolarisator; 7: Emissionspolarisator; 8: Probendetektor; 9: Emissionsmonochromator.

Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt im Fluoreszenzspektrometer K2 über eine Xenon-Bogenlampe mit 300 W maximaler Strahlungsleistung als Lichtquelle (1). Das von der Lichtquelle emittierte Licht wird mit Hilfe einer Linse auf den Eintrittspalt des Anregungsmonochromators (2) fokussiert. Innerhalb dieses Monochromators erfolgt die spektrale Zerlegung des Lichtes an einem konkaven holographischen Gitter mit 1200 Linien / mm, das die Auswahl einer zentralen Anregungswellenlänge in Schritten von $\Delta\lambda = 0,25$ nm im Spektralbereich von $\lambda = 200$ -860 nm erlaubt. Bei feststehender Breite von Eintritts- und Austrittsspalt (0,5, 1 oder 2 mm) werden schmale Spektralbereiche konstanter Weite (4, 8 oder 16 nm) aus dem energetisch aufgespaltenen Spektrum selektiert. In statischen Untersuchungen wird das so erzeugte monochromatische Licht über einen Spiegel an der Ecke eines Zwei-Wege-Polarisators (3) direkt auf einen Strahlteiler gelenkt, wohingegen das Anregungslicht für zeitaufgelöste Untersuchungen beim Durchqueren einer Pockels-Zelle (4) zunächst hochfrequent intensitätsmoduliert wird. Ein Teil der Strahlung wird in statischen Messungen vom Strahlteiler über eine Rhodamin B–Referenzprobe als sogenanntem

„Quantum Counter“ auf den Referenzphotomultiplier (5) weitergeleitet (in zeitaufgelösten Messungen wird die Referenzprobe durch eine Lochblende ersetzt). Rhodamin B absorbiert im Spektralbereich von $\lambda = 220\text{-}600\text{ nm}$ und emittiert Fluoreszenzstrahlung mit konstant hoher Quantenausbeute fast ausschließlich bei 630 nm . Sein Einsatz ermöglicht die Korrektur der Fluoreszenzintensität der Probe in Hinblick auf die wellenlängenabhängige Intensität der Anregungsstrahlung, zeitliche Intensitätsfluktuationen der Strahlungsquelle und die wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des Detektors [Lakowicz 1999]. Der andere Teil der Anregungsstrahlung gelangt, ausgehend vom Strahlteiler, über eine fokussierende Linse in den Probenraum. Zur Messung der statischen Anisotropie kann zwischen Strahlteiler und Linse ein Anregungspolarisator (6), mit dem linear polarisierte Strahlung im Winkelbereich von $0^\circ\text{-}90^\circ$ erzeugt werden kann, in den Strahlengang geschwenkt werden. Im Probenraum befinden sich entweder zwei temperierbare Küvettenhalter oder ein temperierbarer Hochdruckautoklav. Die Fluoreszenzstrahlung kann nach Fokussierung durch eine Linse entweder über den Probendetektor auf der linken oder auf der rechten Seite des Probenraumes detektiert werden. Für Anisotropiemessungen können Emissionspolarisatoren (7) zur Selektion von linear polarisierter Emissionsstrahlung in einem Winkelbereich von $0^\circ\text{-}90^\circ$ in den Strahlengang zwischen Linse und Detektor geschwenkt werden. Bei Nutzung des linken Detektors (für zeitaufgelöste Messungen) können Teilbereiche des Emissionsspektrums durch Platzierung geeigneter Filter zwischen Polarisator und Detektor selektiert werden. Im rechten Emissionskanal erfolgt dagegen die spektrale Zerlegung der Emissionsstrahlung in einem Monochromator (9) an einem konkaven holographischen Gitter mit 1200 Linien/mm , dessen optimaler Arbeitsbereich im Spektralbereich von $\lambda = 350\text{-}800\text{ nm}$ liegt. Emissionsspektren können demnach nur über den rechten Emissionskanal aufgenommen werden.

Hochdruckmessungen und Druckerzeugung

Für die druckabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurde eine von ISS konstruierte Hochdruckzelle verwendet. Ihr Aufbau ist schematisch in Abbildung 4.3 dargestellt.

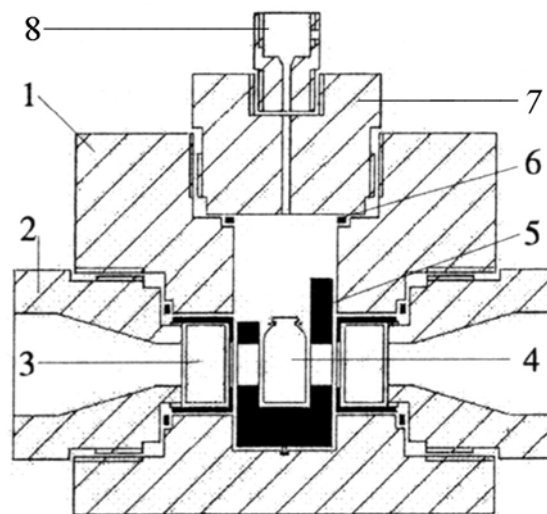


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Hochdruckzelle im Querschnitt. 1: Stahlmantel; 2: Fensterschraube; 3: Quarzglas-Fenster; 4: Probenbehältnis; 5: Probenhalterung; 6: O-Ring zur Abdichtung; 7: verschraubbarer Aufsatz; 8: Ansatz für die Hochdruckkapillare.

Die Hochdruckzelle besteht aus einem Stahlmantel mit seitlichen Bohrungen für Fensterschrauben, mit denen drei Fenster (eines im Anregungsstrahlengang und je eines im rechten bzw. linken Emissionsstrahlengang) fixiert werden. Die Verwendung von Quarzglas als Fenstermaterial beschränkt den anwendbaren Maximaldruck auf $p_{\max} = 3$ kbar. Innerhalb des Stahlmantels befindet sich eine weitere vertikale Bohrung für die Probenhalterung, in die das Probenbehältnis eingesetzt wird. Als Probenbehältnis dient ein Quarzglasfläschchen (Glasbläserei, Universität Dortmund), das durch eine, mit einem O-Ring fixierte, flexible Polyethylenfolie (DURASEAL[®] von Sigma, Taufkirchen) verschlossen wird. Durch die Verwendung von spektroskopisch reinem Ethanol als umgebendem Druckmedium werden Korrosionsschäden innerhalb der Druckzelle vermieden. Die Hochdruckerzeugung erfolgt über eine, der Hochdruckzelle angeschlossene, flexible Stahlkapillare mit Hilfe eines Systems zur automatisierten Druckgeneration und -kontrolle von APP (Ithaca, NY). Dieses Automated Pressure Control System (APCS) besteht aus einem motorisierten Druckgenerator, einem Druckmesskopf, zwei motorisierten Ventilen und einer Steuereinheit. Der Druckgenerator wird computergesteuert über die Treiber-Software (APCSwin V5.0) bedient. Laut Hersteller erfolgt die Messung des Druckes über den Druckmesskopf bis zu 60000 psi (ca. 4,1 kbar) mit einer Genauigkeit von 30 psi (ca.

2,1 bar). Um eine Zerstörung der Quarzfenster infolge von Drucksprüngen zu vermeiden, ist die Maximalgeschwindigkeit für Druckänderungen auf ± 200 psi/s begrenzt.

4.2.2 Durchführung und Auswertung der Messungen

Alle statischen fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden im *photon counting mode*, die zeitaufgelösten Messungen hingegen im *analog mode* durchgeführt. Mit Ausnahme der Hochdruckmessungen wurden jeweils 1 cm x 1 cm Küvetten aus UV-durchlässigem Quarzglas der Firma Hellma (Müllheim) als Probengefäße verwendet.

4.2.2.1 ThT-Assay

Für den *in situ* ThT-Assay wurden, mit Ausnahme der Untersuchungen in Anwesenheit von Lipidvesikeln, Proben mit 0,5 Gew.% Insulin und einem molaren Insulin:ThT-Verhältnis von 50:1 bei pH 1,9 verwendet. Die Proben wurden jeweils in den vorbeheizten Küvettenhalter bzw. Hochdruckautoklaven eingesetzt, so dass nach ca. 10 min thermischer Äquilibration die gewünschte Probentemperatur erreicht wurde. Zur Temperierung mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ °C wurde ein externer F 25-MV Umlaufthermostat der Firma Julabo (Seelbach) verwendet. Die Fluoreszenzemission der Proben wurde bei 482 nm nach Anregung bei 450 nm detektiert, wobei im Anregungs- und Emissionsstrahlengang jeweils eine Spaltbreite von 1 mm verwendet wurde. Um den Aggregationsfortschritt zeitlich zu dokumentieren, wurde die Fluoreszenz im Anschluss an die Äquilibrationsphase alle 30 s gemessen und jeweils über 4 s gemittelt.

Kinetische Untersuchungen unter dem Zusatz von Cosolventien

Für die systematische Untersuchung des Einflusses verschiedener Cosolventien auf die Aggregationskinetik von Insulin bei 50 °C wurden je 2 ml der Proteinlösungen in je 0-40 Gew.% EtOH, TFE und Glycerol mit jeweils 0,1 M NaCl verwendet. Die Proben wurden dabei kontinuierlich mittels eines Magnetrührstäbchens durchmischt. Die aufgenommenen zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensität wurden zur Auswertung unter der Annahme eines Keimbildungs-abhängigen Aggregationsverhaltens [Harper 1997] mit dem Origin 6.0 Software Paket (Microcal, Southampton, USA) normiert und empirisch an ein sigmoides Modell angepasst [Nielsen 2001a]:

$$I_{\text{norm}} = 1 - \frac{1}{1 + (\exp(t - t_{0,5})/g)} \quad (4.3)$$

Hierbei sind I_{norm} die normierte Fluoreszenzintensität, t die Aggregationszeit, $t_{0,5}$ die Zeit bis zur halbmaximalen Aggregation und g ein Parameter, der die Geschwindigkeit des Fluoreszenzanstiegs beschreibt. Aus den angepassten Daten wurden die maximalen Wachstumsraten, r_{max} , und die lag-Zeiten für die Aggregation als empirische kinetische Parameter ermittelt. Die maximale Wachstumsrate entspricht dabei der Steigung der Tangente am Wendepunkt des Sigmoids, und die lag-Zeit entspricht dem Schnittpunkt der Wendetangente mit der Zeitachse.

Kinetische Untersuchungen unter Hochdruck

Für die Untersuchungen der Aggregationskinetik unter Hochdruck zwischen 1 bar und 2 kbar bei 60 °C wurden Insulinproben mit 0, 5 und 20 Gew.% EtOH mit jeweils 0,1 M NaCl verwendet und die Aggregation ohne mechanisches Durchmischen zeitlich verfolgt. Die kinetischen Daten wurden in diesem Falle normiert und an ein doppelt-sigmoides Modell angepasst, da die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensität in einigen Fällen einen Vor- und einen Hauptübergang aufwiesen:

$$I_{\text{norm}} = 1 - \frac{a}{1 + \exp((t - t_{0,5})/g)} - \frac{1 - a}{1 + \exp((t - t'_{0,5})/g')} \quad (4.4)$$

wobei a das normierte obere Fluoreszenzplateau des Vorübergangs ist. $t_{0,5}$ und $t'_{0,5}$ sind die Zeiten, bei denen für Haupt- bzw. Vorübergang die halbmaximale normierte Fluoreszenzintensität beobachtet wird. g und g' entsprechen dem Parameter in Gleichung (4.3) für den Haupt- bzw. Vorübergang. Für beide Übergänge wurden, in Anlehnung an das Vorgehen bei den Cosolvens-abhängigen Untersuchungen, maximale Wachstumsraten und lag-Zeiten ermittelt. Bei Abwesenheit eines sichtbaren Vorübergangs, d. h., für $a = 1$, vereinfacht sich Gleichung (4.4) zu Gleichung (4.3).

Zum Verständnis des Zustandekommens eines Vorüberganges bei niedrigen Drücken in Abwesenheit von EtOH wurden zusätzlich ergänzende kinetische Messungen mit

ausschließlich wässrigen Insulinlösungen in einer Fluoreszenzküvette bei 1 bar durchgeführt. Dazu wurden die Aggregationsverläufe in 0,1 M NaCl mit und ohne mechanische Durchmischung sowie ohne NaCl ohne mechanische Durchmischung zeitabhängig aufgenommen und vergleichend qualitativ interpretiert.

Drucksprunguntersuchungen

Das Hochdruckverhalten von Insulin in unterschiedlichen Aggregationsstadien wurde mit Hilfe von Drucksprüngen an ausschließlich wässrigen Insulinlösungen in 0,1 M NaCl untersucht. Dazu wurden bei 60 °C nach 35 min (Erreichen eines Fluoreszenzplateaus für den Vorübergang) bzw. 122 min (vollständige Aggregation) positive Drucksprünge von 1 kbar innerhalb von ca. 2 min auf die Proben ausgeübt und die Proben nach Stabilisierung des beobachteten Signals wieder auf 1 bar relaxiert, wobei jeweils die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität infolge der Drucksprünge detektiert wurde. Analog wurde das Ausmaß der statischen Lichtreuung von Insulinaggregaten an einer Proteinprobe ohne ThT stichprobenhaft bei $\lambda_{em} = \lambda_{ex} = 350$ nm untersucht, um die Änderung der ThT-Fluoreszenz mit einer Änderung der Teilchengröße der Aggregate zu korrelieren.

Da bei 60 °C die Proben auch nach einem positiven Drucksprung weiter aggregieren, wurden in einer weiterführenden qualitativen Messreihe die Proben vor einem Drucksprung zunächst innerhalb von ca. 5 min auf 20 °C abgekühlt, um eine weitere temperaturinduzierte Aggregation zu minimieren.

Für eine quantitative Analyse des beobachteten druckinduzierten Disaggregationsverhaltens der Aggregate, die sich während des Vorübergangs bilden, wurden die Proben nach 35 min Aggregation bei 1 bar und 60 °C auf 10-30 °C abgekühlt und die Abnahme der ThT-Fluoreszenz nach Drucksprüngen zwischen 1 bar und 2 kbar zeitlich verfolgt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf die maximale Intensität nach den jeweiligen Drucksprüngen normiert und die Abnahme der normierten Intensitäten, I_{norm} , an ein monoexponentielles Modell angepasst:

$$I_{norm} = e^{-k_{diss} \cdot t} \quad (4.5)$$

Die Anpassung liefert jeweils die scheinbare Geschwindigkeitskonstante, k_{diss} , für die Dissoziation der Aggregate. Das Modell basiert auf der Annahme, dass eine Aggregatpopulation mit homogener Größe und Drucksensitivität in Lösung vorliegt, was sicherlich eine Vereinfachung darstellt. Da aber weder die genaue Größenverteilung der Aggregate noch deren Drucksensitivität bekannt sind, ist das einfache, empirische monoexponentielle Modell alternativen, höherexponentiellen Modellen wahrscheinlich vorzuziehen.

Anhand von Eyring- und Arrhenius-Auftragungen von k_{diss} wurden das scheinbare Aktivierungsvolumen, $\Delta V_{\text{diss,app}}^\ddagger$, und die scheinbare Aktivierungsenergie, $E_{\text{a,app}}$, für die Dissoziation früher Insulinaggregate ermittelt:

$$\left(\frac{\partial \ln k_{\text{diss}}}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V_{\text{diss,app}}^\ddagger}{RT} \quad (4.6)$$

$$\left(\frac{\partial \ln k_{\text{diss}}}{\partial (1/T)} \right)_p = - \frac{E_{\text{a,app}}}{R}, \quad (4.7)$$

wobei p der Druck, T die Temperatur und R die allgemeine Gaskonstante sind.

Kinetische Messungen in Anwesenheit von Lipidvesikeln

Die Kinetik der Insulinaggregation in Anwesenheit von Lipidvesikeln wurde in HCl, pH 1,9 bzw. 10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,4 (jeweils ohne und mit 0,1 M NaCl) untersucht. Die Proben enthielten jeweils 0,05 Gew.% (86 μM) Insulin, 17 μM ThT und 860 μM Lipid ([Insulin]:[ThT]:[Lipid] = 1:0,2:10). Die zeitabhängige Aufnahme der ThT-Emission erfolgte bei 60 °C unter mechanischer Durchmischung mit einem Magnetrührstäbchen. Die Aggregationskinetik bei Zusatz reiner DSPC-Vesikel wurde zusätzlich bei pH 1,9 zwischen 54 °C und 68 °C und bei pH 7,4 zwischen 52 °C und 60 °C untersucht, wobei jeweils der Gel-Fluid-Phasenübergang des Lipids innerhalb des angegebenen Temperaturbereich liegt. Die Datensätze wurden an ein einfach-sigmoides Modell (analog Gleichung (4.3)) angepasst und jeweils die Zeiten bis zur

halbmaximalen Aggregation als empirisches Maß für die Aggregationsgeschwindigkeit ermittelt [Knight 2004].

4.2.2.2 Untersuchungen mit Alexa 488 markiertem Insulin

Zur Untersuchung der Rotationsdynamik von Insulin unter dem Einfluss von Cosolventien und unter Druck wurden Fluoreszenz-Anisotropie- und Lebensdauermessungen mit Alexa 488-markiertem Insulin durchgeführt.

4.2.2.2.1 Messungen der statischen Anisotropie

Die Messungen der statischen Anisotropie erfolgten über den rechten Emissionskanal des K2-Spektrometers mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, wobei Spaltbreiten von je 1 mm im Anregungs- und Emissionsstrahlengang verwendet wurden. Um der unterschiedlichen Empfindlichkeit des Probedetektors für vertikal und horizontal polarisierte Emissionsstrahlung Rechnung zu tragen, wurden alle Anisotropiewerte geräteintern um einen wellenlängenabhängigen Gerätefaktor korrigiert [Lakowicz 1999]. Bei Messungen der statischen Anisotropie unter Hochdruck muss darüber hinaus der Einfluss von druckinduzierter Doppelbrechung im Fenstermaterial (Quarzglas) des Hochdruckautoklaven auf die gemessenen Anisotropiewerte berücksichtigt und korrigiert werden. Zur experimentellen Ermittlung entsprechender Korrekturfaktoren wurde auf eine von Paladini und Weber entwickelte Methode zurückgegriffen [Paladini 1981b]. Diese Methode beruht auf der Messung der Polarisation einer Probenlösung eines rein lichtstreuenden Materials bei Raumtemperatur. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde als solche eine 30 gewichtsprozentige Lösung von kolloidem SiO_2 in H_2O (Ludox[®] AM-30) verwendet. Bei den diskreten Wellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 490$ nm sowie $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}} = 520$ nm wurde bei Atmosphärendruck zunächst der wellenlängenabhängige Gerätefaktor ermittelt. Anschließend wurden mit dem im Strahlengang vertikal ausgerichteten Anregungspolarisator in Abhängigkeit vom Druck jeweils die Intensitäten der vertikal und horizontal polarisierten Streustrahlung bei diesen zwei Wellenlängen gemessen und die Polarisationswerte $P_{\text{m}}(\lambda, p)$ nach Gleichung (3.3) berechnet. Die bei $p = 1$ bar ermittelten Polarisationswerte dienen als Referenz $P_{\text{r}}(\lambda)$. Die Korrekturfaktoren $\alpha(\lambda, p)$ ergeben sich zu:

$$\alpha(\lambda, p) = \frac{[P_m(\lambda, p)/P_r(\lambda, p)] - 1}{P_m(\lambda, p) - 3} \quad (4.8)$$

Die korrigierten Polarisationswerte $P_{\text{kor}}(\lambda, p)$ lassen sich damit folgendermaßen berechnen:

$$P_{\text{kor}}(\lambda, p) = \left[\frac{1 - 2\alpha_{\text{em}}(\lambda, p) - \alpha_{\text{ex}}(\lambda, p)}{P_m(\lambda, p)} + \alpha_{\text{ex}}(\lambda, p) \right]^{-1} \quad (4.9)$$

Unter Zuhilfenahme von Gleichung (3.4) wird schließlich die korrigierte Anisotropie berechnet.

Untersuchungen unter dem Zusatz von Cosolventien

Für die Messungen der statischen Anisotropie in Abhängigkeit von der Temperatur wurden Lösungen mit je 0,5 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl in Wasser sowie in 20 Gew.% HAc, EtOH, TFE und Glycerol bei pH 1,9 verwendet. Der Anteil von Alexa 488-markiertem Insulin betrug jeweils 0,1 mol% an der Gesamtstoffmenge des Insulins. Im Temperaturbereich von 5 °C bis 90 °C wurde in 3 °C-5 °C-Schritten die Anisotropie der Proben über jeweils 1 min gemittelt, wobei die Proben nach jeder Temperaturerhöhung für ca. 10 min thermisch äquilibriert wurden, so dass die Temperatur effektiv mit einer Heizrate von ca. 20 °C/h erhöht wurde. Die Analyse der Anisotropiedaten erfolgte in Form einer linearisierten Perrin-Auftragung (vgl. Gleichungen (3.5) und (3.6)) unter der Annahme, dass der Fluorophor keine lokalen, von der Proteinrotation entkoppelten, Rotationsbewegungen vollführt [Weber 1953]:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{k_B \langle \tau \rangle}{r_0 V_h} \cdot \frac{T}{\eta} \quad (4.10)$$

Hierbei ist r_0 die Grenzanisotropie des Alexa 488-Fluorophors ($r_0 = 0,376$ [Rusinova 2002]) und $\langle \tau \rangle$ dessen mittlere Fluoreszenzlebensdauer. Die Viskosität des

Lösungsmittels wurde der angegebenen Literatur entnommen und - wo benötigt - interpoliert [Vogelpohl 1955], [Scheffler 1981], [Esteve 1995]. Die Auftragung von $1/r$ gegen T/η mit Origin 6.0 liefert für den Fall, dass sich das markierte Protein wie eine Kugel mit dem Volumen V_h bzw. dem Radius R_h verhält, eine Gerade. Unter der vereinfachenden Annahme, dass r_0 konstant und $\langle \tau \rangle$ unabhängig von der Lösungsmittelzusammensetzung ist, kann das Verhältnis der Volumina (und somit das Ausmaß der Proteinassoziation), $V_{h,1}/V_{h,2}$, des Proteins in verschiedenen Lösungsmitteln (1 und 2) aus dem inversen Verhältnis der Steigungen der entsprechenden Perrin-Auftragungen berechnet werden. Zur Ermittlung des absoluten hydrodynamischen Volumens des Proteins unter den verschiedenen Lösungsmittelbedingungen muss dagegen zusätzlich die mittlere Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors ermittelt werden (siehe Kapitel 4.2.2.2.2).

Die Konzentrationsabhängigkeit der frühen Phase der Aggregationskinetik des Proteins unter dem Einfluss der verschiedenen Cosolventien wurde an Lösungen mit 0,02 Gew.%, 0,1 Gew.% und 0,5 Gew.% Insulin (je 0,1 mol% mit Alexa 488 markiert) bei 50 °C untersucht. Nach 10 min thermischer Äquilibration der Proben im vorgeheizten Küvettenhalter wurde alle 30 s die Fluoreszenzanisotropie gemessen und über je 10 s gemittelt, wobei die Proben kontinuierlich mittels eines Magnetrührstäbchens durchmisch wurden. Unter Verwendung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors bei 50 °C im jeweils entsprechenden Lösungsmittel wurde das hydrodynamische Volumen des Proteins und dessen zeitliche Änderung zu Beginn der Aggregation (als Maß für die anfängliche Aggregationsgeschwindigkeit) ermittelt.

Untersuchungen unter Hochdruck

Lösungen von je 0,5 Gew.% Insulin (0,1 mol% mit Alexa 488 markiert) in 0,1 M NaCl mit 0, 5 und 20 Gew.% EtOH, pH 1,9 wurden bei 20 °C druckabhängig zwischen 1 bar und 2 kbar untersucht. Dazu wurden die Proben im Hochdruckautoklaven temperiert und die Anisotropie im Anschluss an Druckerhöhungen in 200 bar-Schritten nach 10-minütiger Äquilibration gemessen. Für die Untersuchungen des Einflusses von Hochdruck auf die Aggregationskinetik des Proteins bei 60 °C wurden dieselben Proben für 15 min bei Drücken zwischen 1 bar und 1,5 kbar äquilibriert, innerhalb von ca.

10 min auf 60 °C temperiert und anschließend die Anisotropie zeitabhängig im Abstand von 30 s gemessen. Unter Verwendung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors und der Viskosität des Lösungsmittels unter jeweils entsprechenden Cosolvens-, Druck- und Temperaturbedingungen [Vogelpohl 1955], [Scheffler 1981], [Yusa 1977], [Abaszade 1971] wurde mittels Gleichung (4.10) das hydrodynamische Volumen der Proteinassoziate bei 20 °C und zu Beginn der Aggregation bei 60 °C ermittelt.

Die druckinduzierte Dissoziation von frühen Insulinaggregaten, die sich bei der Inkubation von 0,5 Gew.% Insulin in Wasser / 0,1 M NaCl bei 1 bar und 60 °C bilden, wurde anhand von Anisotropiemessungen im Anschluss an einen positiven Drucksprung untersucht. Dazu wurde die mit Alexa 488 markierte Proteinprobe für 35 min bei 60 °C inkubiert, innerhalb von ca. 5 min auf 20 °C abgekühlt, der Druck innerhalb von ca. 2 min auf 1 kbar erhöht und im Anschluss die Anisotropie zeitabhängig alle 30 s gemessen. Unter Zuhilfenahme der entsprechenden Fluoreszenzlebensdauer wurde auf Basis von Gleichung (4.10) die zeitliche Abnahme des hydrodynamischen Volumens der Proteinaggregate infolge des Drucksprunges ermittelt.

4.2.2.2 Zeitaufgelöste Messungen

Die Messungen der Fluoreszenzlebensdauer von Alexa 488 unter verschiedenen Cosolvens-, Temperatur- und Druckbedingungen wurden am K2 Spektrometer mit Hilfe der Multifrequenzdomänentechnik durchgeführt [Lakowicz 1999]. Bei dieser Technik wird das kontinuierlich von der Xe-Bogenlampe emittierte Anregungslicht mit Hilfe einer Pockels-Zelle periodisch intensitätsmoduliert. Zur Erzeugung intensitätsmodulierter Anregungsstrahlung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein 2022D-Frequenzgenerator (Marconi Instruments, Bedfordshire, UK) eingesetzt, dessen Signal mit Hilfe eines Breitbandverstärkers, Modell 525LA von ENI (Hertfordshire, UK) leistungsverstärkt wurde. Ein Teil der Anregungsstrahlung wurde im zeitaufgelösten Messbetrieb über einen Strahlteiler durch eine Lochblende auf den Referenzdetektor fokussiert, während der andere Teil die Probe zur Fluoreszenz anregte, die über den linken Emissionskanal nach Durchqueren eines geeigneten optischen Filters detektiert wurde. Aufgrund der endlichen Fluoreszenzlebensdauer der Fluorophore ist die

Modulation der Emissionsstrahlung gegenüber der Modulation der Anregungsstrahlung phasenverschoben und intensitätsgeschwächt. Das Ausmaß der Phasenverschiebung ϕ und des Demodulationsgrades m ist eine Funktion der Modulationsfrequenz der Anregungsstrahlung und wurde zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer bei mehreren Frequenzen gemessen, da dem zeitlichen Abklingverhalten der Fluoreszenz *a priori* kein monoexponentielles Zeitgesetz zugrunde gelegt wurde. Zur Erhöhung der Genauigkeit der Messungen wurde die Technik der Kreuzkorrelationsfrequenz-Detektion genutzt, bei der die Spannung innerhalb der Messelektronik der Detektoren synchron zur Modulation der Anregungsstrahlung, aber phasenverschoben, periodisch verändert wird. Auf diese Weise werden sämtliche Informationen über den Demodulationsgrad und die Phasenverschiebung der detektierten Referenz- und Probenstrahlung auf die niedrige Kreuzkorrelationsfrequenz ($\omega_c = 400$ Hz) transformiert. Die so ermittelten Werte für die Phasenverschiebung ϕ und den Demodulationsgrad m sind aufgrund der Reaktionszeiten der Messelektronik um einen willkürlichen Betrag modifiziert und müssen daher mit Hilfe eines Lebensdauerstandards korrigiert werden.

Die Datenanalyse erfolgte mit der Software *Globals Unlimited, Version 2.1* (Laboratory for Fluorescence Dynamics at the University of Illinois at Urbana-Champaign, 1990) unter simultaner Verwendung von Phasenverschiebung und Demodulationsgrad, für die jeweils eine Standardabweichung von $\Delta\phi = 0,2^\circ$ und $\Delta m = 0,004$ festgesetzt wurde, um die Datenanalyse zu beschleunigen [Alcala 1987]. Das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz wurde empirisch mit Hilfe eines biexponentiellen Zeitgesetzes beschrieben, so dass für die mittlere Fluoreszenzlebensdauer gilt [Lakowicz 1999]:

$$\langle \tau \rangle = f_1 \cdot \tau_1 + f_2 \cdot \tau_2 \quad (4.11)$$

Hierbei sind τ_1 und τ_2 die beiden Lebensdauerkomponenten und f_1 und f_2 deren jeweiliger Anteil an der normierten Gesamtfluoreszenzintensität.

Untersuchungen unter dem Zusatz von Cosolventien

Die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von Alexa 488 in unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen (Wasser, je 20 Gew.% HAc, EtOH, TFE bzw. Glycerol) wurde im Temperaturbereich von 5 °C – 70 °C in 0,1 M NaCl, pH 1,9 untersucht. Zur Vermeidung von Lichtstreuungsartefakten infolge signifikanter Proteinaggregation wurden alle Messungen mit 2 µM hydrolyseresistentem Alexa-488-C₅-Maleinimid anstelle von Alexa 488-markiertem Insulin durchgeführt. Die Verwendung des freien Fluorophors anstelle des Proteinkonjugates scheint zudem auch durch die Annahme berechtigt, dass aufgrund der Größe des Fluorophors lediglich dem Lösungsmittel relativ frei zugängliche reaktive Aminogruppen des Proteins markiert werden. Die Deaktivierung der Fluoreszenz sollte demnach vorwiegend durch das umgebende Lösungsmittel erfolgen. Nach jeweils 10 min thermischer Äquilibration bei wurden die Phasenverschiebung und der Demodulationsgrad der Fluoreszenz nach Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm im Frequenzbereich von 2-200 MHz bei 20 Frequenzen auf einer logarithmischen Skala gemessen. Die Selektion des detektierten Wellenlängenbereichs der Emissionsstrahlung erfolgte über einen OG-515 Hochpassfilter (Schott, Mainz). Als Lebensdauerstandard wurde eine Rhodamin 6G-Probe in Ethylenglykol verwendet ($\tau = 3,6$ ns).

Untersuchungen unter Hochdruck

Für die zeitaufgelösten Messungen unter Hochdruck wurden je 0,5 Gew.% Alexa 488-markiertes Insulin (Markierungsgrad 1:1000) in 0,1 M NaCl sowie 0, 5 und 20 Gew.% EtOH verwendet. Bei 20 °C wurden zwischen 1 bar und 2 kbar die Phasenverschiebung und der Demodulationsgrad der Fluoreszenz im Frequenzbereich von 2-200 MHz bei 15 Frequenzen auf einer logarithmischen Skala gemessen. Vor jeder Messung wurden die Proben für 10 min bei dem entsprechenden Druck äquilibriert. Für Lebensdauermessungen im Druckbereich von 1 bar bis 1,5 kbar bei 60 °C wurden die Proben zunächst jeweils für 10 min bei dem jeweiligen Druck bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die Temperatur so schnell wie möglich auf 60 °C erhöht und 10 min nach dem Start der Temperaturerhöhung mit den Messungen begonnen. Die Phasenverschiebung und der Demodulationsgrad der Fluoreszenz wurden im Frequenzbereich von 8-200 MHz bei 5 Frequenzen auf einer logarithmischen Skala

gemessen, so dass innerhalb von ca. 15 min ein kompletter Datensatz aufgenommen wurde. Für alle Messungen wurden die Proben bei $\lambda_{\text{ex}} = 489 \text{ nm}$ angeregt. Unter Verwendung eines Filtrerrades im Emissionsstrahlengang erfolgte die Selektion des detektierten Wellenlängenbereichs abwechselnd über einen OG-515 Hochpassfilter (Schott, Mainz) sowie über einen 03 FIR 002 486,1 nm Interferenzfilter (Melles Griot, Bensheim). Der Einsatz des Interferenzfilters ermöglicht bei Abwesenheit eines externen Lebensdauerstandards die Verwendung des Signals der Rayleigh-Streuung der Probe als internen Lebensdauerstandard ($\tau = 0 \text{ ns}$).

4.3 CD-Spektroskopie

4.3.1 Durchführung und Auswertung der Messreihen

Alle CD-Untersuchungen wurden an einem J-715 Spektropolarimeter der Firma Jasco (Tokio, Japan) unter konstantem Stickstoffstrom mit wässrigen Insulinlösungen in 0,1 M NaCl, pH 1,9 und Cosolvskonzentrationen bis zu 50 Gew.% EtOH, TFE bzw. Glycerol durchgeführt. Als Probengefäße dienten zylindrische Küvetten der Firma Hellma (Müllheim), die über einen F 25-MV Umlaufthermostaten von Julabo (Seelbach) mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert wurden. CD-Spektren im nahen und fernen UV wurden in Abhängigkeit von der Cosolvkonzentration nach 15 min thermischer Äquilibrierung bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Zeitabhängig wurden Spektren im fernen UV nach Temperierung auf $61 \text{ }^\circ\text{C}$ im Abstand von 15 min aufgenommen. Die jeweiligen Proben- und Geräteparameter sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Vor einer weiteren Analyse wurden die Spektren um den Beitrag des jeweiligen Lösungsmittels untergrundkorrigiert und anschließend die CD-Daten in Form der molaren residuengewichteten Elliptizität $[\theta(\lambda)]$ dargestellt:

$$[\theta(\lambda)] = \frac{\theta(\lambda) \cdot MRW}{d \cdot c} \quad (4.12)$$

Hierbei ist $\theta(\lambda)$ das gemessene Spektrum, MRW die mittlere residuengewichtete Molmasse, c die Einwaagekonzentration und d die Durchstrahlstärke der Probe.

Die so erhaltenen Spektren wurden im fernen UV im Bereich von $\lambda = 195\text{-}240\text{ nm}$ hinsichtlich der Sekundärstrukturzusammensetzung des Proteins mit dem Convex Constraint Analysis (CCA)-Programm von Perczel et al. analysiert [Perczel 1991], [Perczel 1992]. Dabei wird das gemessene CD-Spektrum simultan mit einem Satz von CD-Referenzspektren von Proteinen und Modellpeptiden bekannter Sekundärstrukturzusammensetzung analysiert, wobei alle Spektren als Linearkombination gemeinsamer Basisspektren dargestellt werden. Die so berechneten Basisspektren lassen sich in der Regel eindeutig diskreten Sekundärstrukturelementen zuordnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die CCA-Analyse unter der Annahme von vier Sekundärstrukturkomponenten (α -Helix, β -Strang, Schleifen und Zufallsknäuel) durchgeführt.

Tabelle 4.2: Proben- und Geräteparameter für die Aufnahme von CD-Spektren im nahen und fernen UV.

Parameter	nahes UV	fernes UV
[Insulin] / Gew.%	0,08	0,25
Schichtdicke der Küvette / mm	10	0,1
Wellenlängenbereich / nm	260-350	190-260
Schrittweite / nm	1	1
Scangeschwindigkeit / nm·min ⁻¹	100	200
Response time / s	1	0,5
Empfindlichkeit / m°	100 (hoch)	100 (hoch)
Anzahl Scans	20	20

4.4 UV-Spektroskopie im Rahmen der ANS-Titration

4.4.1 Durchführung und Auswertung der Messreihen

Die UV-Absorption bei $\lambda = 350\text{ nm}$ im Überstand der mit ANS resuspendierten Insulinaggregate (siehe Kapitel 1.1.5) wurde mit der Absorption proteinfreier Proben entsprechender ANS-Konzentration in 0,1 M NaCl, pH 1,9 auf dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 25 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) verglichen. ANS weist in wässriger Lösung bei 350 nm ein Absorptionsmaximum auf [Slavik 1982], während die

Absorption des Insulins bei dieser Wellenlänge vernachlässigbar ist. Die Absorptionsmessungen wurden jeweils um die Absorption des Lösungsmittels untergrundkorrigiert. Der Anteil von am Aggregat gebundenen Farbstoff, f_b , an der Gesamtkonzentration von zugesetztem ANS beträgt:

$$f_b = 1 - \frac{A_s}{A_t}, \quad (4.13)$$

wobei A_s die Absorption im Überstand nach ANS-Bindung durch das Aggregat und A_t die Absorption der proteinfreien ANS-Vergleichsprobe ist. Aus f_b ergibt sich die Bindungskapazität β (= mol gebundener Ligand L / mol Protein P) zu:

$$\beta = \frac{f_b \cdot [L]}{[P]} \quad (4.14)$$

Der Bindungsprozess wurde quantitativ mit Origin 6.0 auf der Basis eines Langmuir-Modells mit n einheitlichen, unabhängigen Ligandenbindungsstellen auf der Proteinoberfläche analysiert [Andrade 1985]:

$$\beta = \frac{K_{app} \cdot n \cdot [L]}{1 + K_{app} \cdot [L]} \quad (4.15)$$

Hierbei ist $[L]$ die ANS-Gesamtkonzentration und K_{app} die scheinbare Bindungskonstante.

4.5 DSC-Untersuchungen

4.5.1 Durchführung und Auswertung der Messungen

Zur Ermittlung der Hauptübergangstemperatur, T_m , von DSPC sowie der Breite des Temperaturbereiches, $FWHH$ (volle Breite auf halber Höhe des DSC-Peaks), in dem der Gel-Fluid-Phasenübergang stattfindet, wurden DSC-Thermogramme von

multilamellaren DSPC-Vesikeln in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 bzw. 10 mM Na-Phosphatpuffer mit 0,1 M NaCl bei pH 7,4 aufgenommen. Multilamellare DSPC-Vesikel wurden bei einer Lipidkonzentration von 8,63 mM, wie in Kapitel 4.1.6 beschrieben, präpariert, wobei auf den abschließenden Extrusionsprozess verzichtet wurde. Die Aufnahme der DSC-Thermogramme erfolgte mit einem VP DSC Mikrokalorimeter der Firma Microcal (Northampton, USA). Die Proben- und Referenzzelle wurde mit jeweils 0,54 ml Lipidprobe bzw. entsprechendem Probenpuffer befüllt und entgast. Nach jeweils 15 min Äquilibrierung bei 5 °C wurden sukzessive 4 DSC-Thermogramme bis zu einer Temperatur von 90 °C bei einer Heizrate von 40 °C/h im *Up Scan*-Modus aufgenommen, um die Reversibilität der Phasenumwandlung zu überprüfen. Durch den Aufbau eines Druckes von ca. 1,8 bar innerhalb der Zellen wurde eine unerwünschte Blasenbildung während des Heizvorganges minimiert. Die Thermogramme wurden anschließend auf die Konzentration des Lipids normiert, mit Hilfe der Gerätesoftware Origin 7.0 (Microcal, Southampton, USA) basislinienkorrigiert und in Hinsicht auf T_m und $FWHH$ analysiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Einfluss von Cosolventien auf das Aggregationsverhalten von Insulin

In diesem Kapitel soll der Einfluss verschiedenartiger Cosolventien (Glycerol, EtOH und TFE) auf das Aggregationsverhalten von Insulin bei $p = 1$ bar dokumentiert und diskutiert werden. Insbesondere wird aufgezeigt, wie unterschiedliche Cosolvenssysteme die Struktur des Proteins vor der Aggregation, die Aggregationskinetik des Proteins bei erhöhten Temperaturen und schließlich die Oberflächeneigenschaften der resultierenden Aggregate modulieren können.

5.1.1 Cosolvenseffekte im prä-aggregierten Zustand des Proteins

5.1.1.1 Rotationsdynamik des Proteins

Unter physiologischen Bedingungen wird Insulin in den β -Zellen der Pankreas in Zn^{2+} -komplexierter Form als natives Hexamer gespeichert [Greider 1969]. Nach seiner Sekretion dissoziiert der hexamere Insulinkomplex, und das Hormon bindet in seiner physiologisch aktiven, monomeren Form an Insulinrezeptoren, wodurch die Signalkaskade des Glukosemetabolismus in Gang gesetzt wird [Brange 1987], [Nystrom 1999]. *In vitro* liegen dagegen Insulinmonomere, -dimere und -hexamere in Abhängigkeit einer Vielzahl von Umgebungsparametern, wie Konzentration, pH-Wert, Temperatur, Lösungsmittel, usw., in einem komplexen Gleichgewicht nebeneinander vor. Zur Ermittlung des Ausmaßes der Assoziation von Insulin bei pH 1,9 vor dem Einsetzen des Aggregationsprozesses wurde die Rotationsdynamik von mit Alexa 488 markiertem Insulin temperaturabhängig für verschiedene Cosolvenssysteme untersucht. In Abbildung 5.1 sind die Ergebnisse der korrespondierenden statischen Anisotropiemessungen in Form von Perrin-Auftragungen dargestellt.

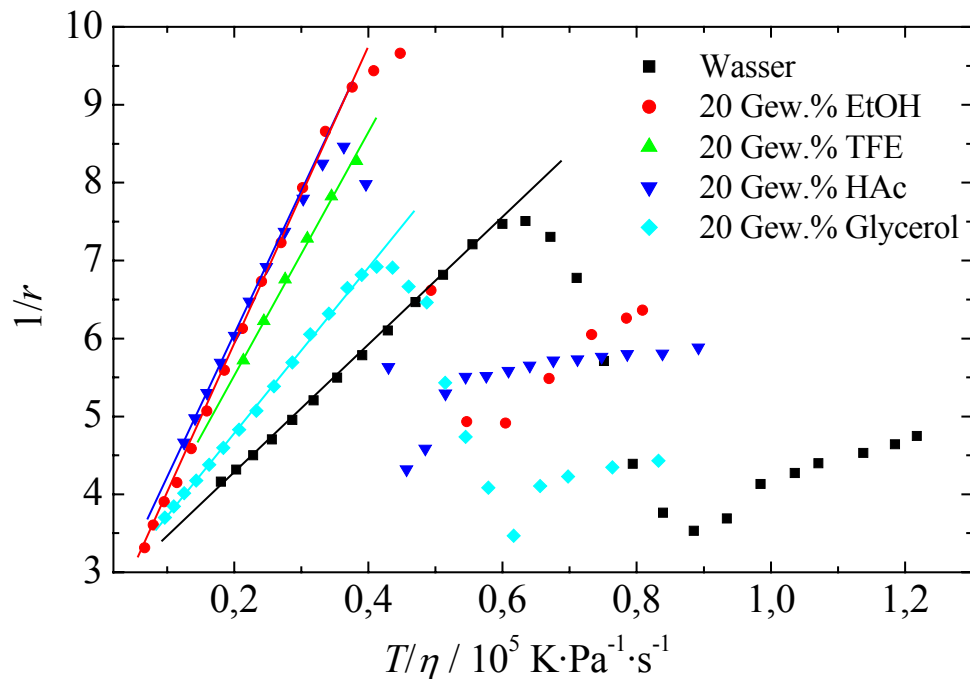


Abbildung 5.1: Perrin-Auftragungen der statischen Anisotropie von 0,5 Gew.% Alexa 488-markierten Insulins in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 in verschiedenen Lösungsmittelsystemen. In Ermangelung an Literaturdaten für die Viskosität sind die Daten für 20 Gew.% TFE nur im Temperaturbereich von 20-50 °C dargestellt. Die eingezeichneten Geraden entsprechen jeweils dem Ergebnis einer linearen Anpassung mit Origin 6.0 nach Gleichung (4.10).

Die Perrin-Auftragungen zeigen im Temperaturbereich vor dem Einsetzen des Aggregationsprozesses bei etwa 50 °C jeweils einen linearen Verlauf. Daher ist das Modell der ungehinderten isotropen Rotationsbewegung zur Beschreibung der Rotationsdynamik des Proteins im prä-aggregierten Zustand offenbar weitgehend zutreffend. Demzufolge kann unter der Annahme einer lösungsmittelunabhängigen mittleren Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophor-Konjugates aus dem inversen Verhältnis der Steigungen der Perrin-Auftragungen das Verhältnis der hydrodynamischen Volumina der Proteinassoziate in den verschiedenen Cosolvenssystemen ermittelt werden. Es ist bekannt, dass Insulin bei niedrigem pH-Wert in 20 Gew.% HAc vorwiegend in monomerer Form vorliegt [Whittingham 2002]. Somit kann die Steigung der zugehörigen Perrin-Auftragung als Bezugspunkt für die Ermittlung des Assoziationsrades des Proteins unter den übrigen

Lösungsmittelbedingungen herangezogen werden. Unter Verwendung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von Alexa 488-C₅-Maleinimid bei 19 °C (siehe Abbildung 7.1 im Anhang) kann zudem der scheinbare Stokes-Radius, R_h des markierten Proteins in den jeweiligen Lösungsmittelsystemen näherungsweise abgeschätzt werden. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 1: Darstellung der Verhältnisse der hydrodynamischen Volumina, V_h , von Insulin in verschiedenen Lösungsmittelsystemen (jeweils bezogen auf V_h in 20 Gew.% HAc) und der entsprechenden Stokes-Radien, R_h , von Insulin bei 19 °C. Unter Berücksichtigung der linearen Regression zur Auswertung der Perrin-Auftragungen und der Fehler der mittleren Lebensdauer des Fluorophors beträgt der mittlere Fehler der Volumenverhältnisse bzw. der Stokes-Radien jeweils $\pm 0,1$ bzw. $\pm 0,5$ Å.

Lösungsmittelsystem	$V_h/V_h(20 \text{ Gew.}\% \text{ HAc})$	$R_h / \text{Å}$
H ₂ O	2,3	14,5
20 Gew.% Glycerol	1,8	13,6
20 Gew.% HAc	1,0	11,8
20 Gew.% EtOH	1,0	12,4
20 Gew.% TFE	1,1	12,4

Offenbar liegt Insulin sowohl in 20 Gew.% EtOH als auch in 20 Gew.% TFE überwiegend in monomerer Form vor, was durch einen Vergleich der gemessenen Stokes-Radien mit dem von Nielsen et al. für das Monomer ermittelten Wert ($R_h = 11,6$ Å) untermauert wird [Nielsen 2001a]. Der Annahme eines überwiegend monomeren Zustandes von Insulin in 20 Gew.% EtOH deckt sich zudem mit der bereits dokumentierten Fähigkeit von EtOH, die Dissoziation höherer Insulinoligomere zu begünstigen [Brems 1990]. Dagegen favorisiert das Protein sowohl in Wasser als auch in 20 Gew.% Glycerol den dimeren Zustand. Im Rahmen des Fehlers stimmt der für Insulin in Wasser ermittelte Stokes-Radius mit dem für das Dimer beobachteten Wert von $R_h = 14,9$ Å überein [Nielsen 2001a], wohingegen der ermittelte Wert für den Stokes-Radius für Insulin in 20 Gew.% Glycerol zwischen dem für das Monomer und das Dimer dokumentierten Wert liegt. In aller Regel wird eine Stabilisierung von

kompakten, nativen Proteinkonformationen und oligomeren Assoziaten in Anwesenheit bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossener Cosolventien, wie Glycerol, beobachtet [Timasheff 1993], [Sasisanker 2004]. Daher deutet der im Vergleich zu dem in Wasser gemessenen Wert für den Stokes-Radius signifikant kleinere Stokes-Radius in 20 Gew.% Glycerol auf eine Kompaktisierung des Insulindimers hin (siehe auch Kapitel 5.1.1.2).

Im Temperaturbereich oberhalb von ca. 50 °C zeigen die Perrin-Auftragungen im Zuge der Proteinaggregation deutliche Abweichungen vom linearen Verhalten. Im Falle einer temperaturinduzierten, transienten Dissoziation von Insulindi- und höheren Oligomeren vor dem Einsetzen des Aggregationsprozesses sollten die Perrin-Auftragungen zunächst einen zur y -Achse gekrümmten Verlauf zeigen. Ein solcher wird nicht beobachtet, so dass eine mögliche transiente Dissoziation wahrscheinlich vom einsetzenden Aggregationsprozess überlagert wird.

5.1.1.2 Tertiärstruktur des Proteins

Die Gestalt des CD-Spektrums von Proteinen im nahen UV wird durch die lokale Umgebung der Chromophore, die in diesem Wellenlängenbereich, und damit der Tertiär- bzw. Quartärstruktur des Proteins bestimmt [Kelly 2000]. Der Einfluss der Konzentration verschiedener Cosolvenszusätze auf die Tertiär- bzw. Quartärstruktur von Insulin bei 20 °C wurde auf der Grundlage der CD-Spektren im nahen UV untersucht. In Abbildung 5.2 sind die kompletten Spektrensätze für Insulin in bis zu 50 Gew.% Glycerol, EtOH und TFE zusammen mit der molaren Elliptizität am Minimum der CD-Bande ($\lambda = 275$ nm) als Funktion der Cosolvenskonzentration dargestellt.

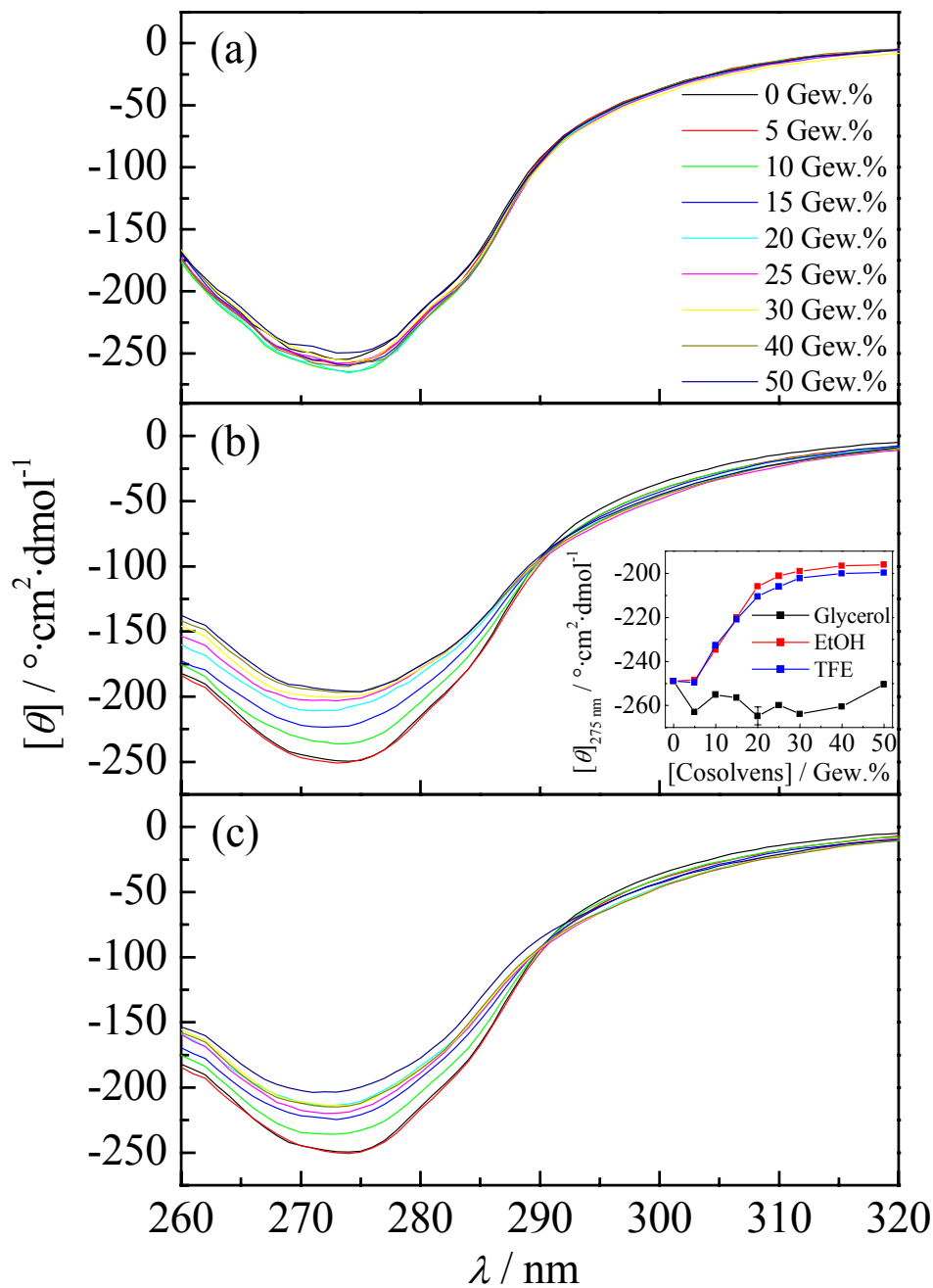


Abbildung 5.2: CD-Spektren im nahen UV für 0,08 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 20 °C bei Zusatz von Glycerol (a), EtOH (b) und TFE (c). Inset: Abhängigkeit der molaren Elliptizität von Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 20 °C am Minimum der CD-Spektren ($\lambda = 275 \text{ nm}$) im nahen UV.

Das CD-Spektrum von Insulin in wässriger Lösung wird durch ein deutliches Minimum bei $\lambda = 275 \text{ nm}$ geprägt. Bei einem EtOH- bzw. TFE-Gehalt oberhalb von 5 Gew.%

nimmt die Bandenintensität, vor allem im Bereich zwischen 5 Gew.% und 20 Gew.% der beiden Alkohole, fortschreitend, jedoch nicht proportional zur Cosolvenskonzentration, ab. Bei den höchsten untersuchten Konzentrationen (50 Gew.%) erreicht die molare Elliptizität Plateauwerte von $-195 \text{ cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ in EtOH und $-200 \text{ cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ in TFE. Im Gegensatz dazu nimmt die Bandenintensität bei dem Zusatz von 5 Gew.% Glycerol leicht zu und bleibt bis zur Zugabe von 50 Gew.% Glycerol weitgehend konstant.

Die Absorption der vier Tyrosinseitenketten (A14, A19, B16, B26) bestimmt maßgeblich das CD-Spektrum von Insulin im nahen UV. Es ist bekannt, dass die Intensität des CD-Signals infolge von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Tyrosin B16 und B26 an der Monomer-Monomer-Grenzfläche im Dimer zunimmt und somit den Assoziationsgrad des Proteins widerspiegelt [Strickland 1976], [Uversky 2003]. Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass Insulin in Gegenwart höherer Konzentrationen von EtOH und TFE vorwiegend in monomerer Form vorliegt, kann die Abnahme der Intensität der CD-Bande mit steigenden Alkoholkonzentrationen weitgehend mit einer Cosolvens-induzierten Dissoziation des Dimers erklärt werden. Die Frage, ob die resultierenden Insulinmonomere in nativer Konformation vorliegen, ist allerdings allein anhand einer Analyse der CD-Spektren im nahen UV nicht zu beantworten. Demgegenüber beruht die leichte Zunahme der Intensität des CD-Signals in Gegenwart von Glycerol wahrscheinlich auf einer dichteren Packung der Tyrosinseitenketten an der Monomer-Monomer-Grenzfläche. Eine damit verbundene Kompaktisierung des Dimers korreliert gut mit der beobachteten Abnahme des Stokes-Radius des Proteins bei Zugabe von 20 Gew.% Glycerol.

5.1.1.3 Sekundärstruktur des Proteins

Um Informationen über den Einfluss der verschiedenen Cosolventien auf die Sekundärstruktur des Proteins zu erhalten, wurden CD-Spektren von Insulin im fernen UV in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Cosolvens bei 20 °C aufgenommen (Abbildung 5.3).

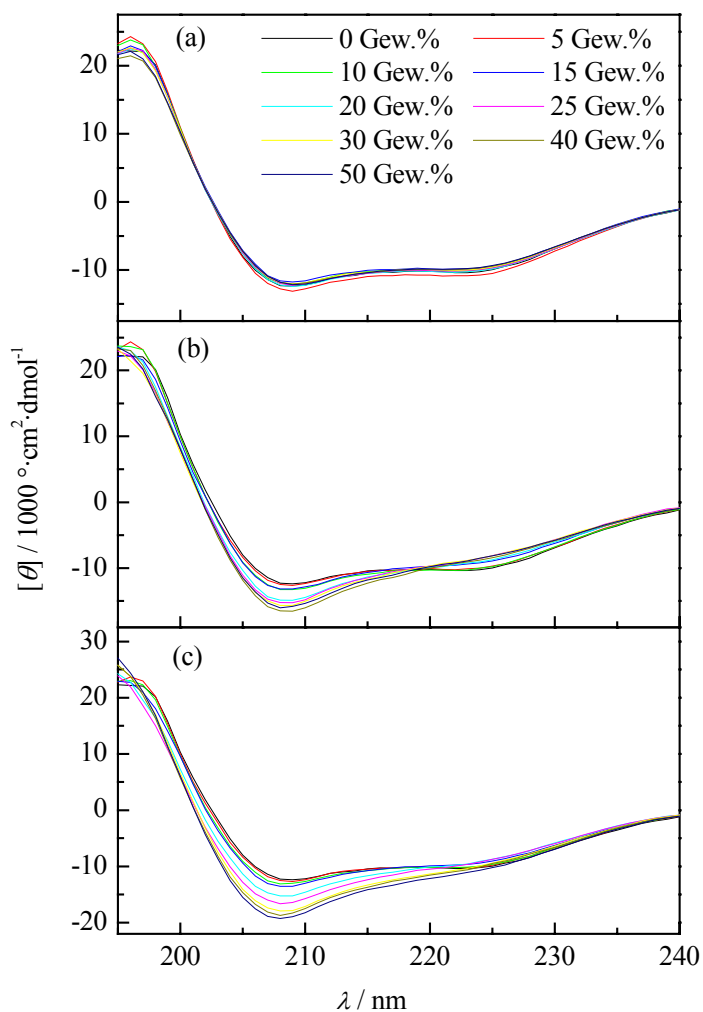


Abbildung 5.3: CD-Spektren im fernen UV für 0,25 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 20 °C bei Zusatz von Glycerol (a), EtOH (b) und TFE (c).

Das CD-Spektrum von Insulin ohne Zusatz von Cosolventien weist zwei Minima bei $\lambda = 208$ nm und $\lambda = 222$ nm auf, die charakteristisch für einen hohen Anteil von α -helikalen Bereichen im nativen, globulären Protein sind. Bei Zugabe von Glycerol bis zu 50 Gew.% wird keine signifikante Änderung der Spektrenform beobachtet, was darauf hinweist, dass die native Faltung des Proteins auf der Ebene der Sekundärstruktur durch Glycerol nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von EtOH und TFE zu einer Zunahme der Bandenintensität bei $\lambda = 208$ nm bei gleichzeitiger Abnahme der Bandenintensität bei $\lambda = 222$ nm. In EtOH weisen die

Spektren darüber hinaus über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich, in TFE dagegen nur bis zu 20 Gew.%, einen isodichroitischen Punkt bei $\lambda = 219$ nm auf. Das Auftreten eines isodichroitischen Punktes deutet an, dass sich eine Cosolvens-induzierte Konformationsänderung von Insulin in EtOH durch ein Zwei-Zustandsgleichgewicht zwischen der nativen und einer teilweise entfalteten Konformation beschreiben lässt. In TFE liegt ein solches Gleichgewicht offenbar nur bis zu 20 Gew.% vor, und eine weitere Erhöhung der TFE-Konzentration scheint graduelle strukturelle Änderungen in der teilweise entfalteten Konformation hervorzurufen.

Für eine quantitative Auswertung der CD-Spektren hinsichtlich der Sekundärstruktur-Zusammensetzung des Proteins wurden die CD-Spektren auf der Grundlage des CCA-Algorithmus analysiert [Perczel 1991], [Perczel 1992]. In Abbildung 7.2 im Anhang sind repräsentative Spektren für die reinen Sekundärstruktur-Komponenten dargestellt, die aus einer Dekonvolution des gemessenen Spektrums von Insulin in Cosolvens-freier, wässriger Lösung nach dem CCA-Algorithmus erhalten wurden. Ein Vergleich mit entsprechenden Referenzspektren erlaubt eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Spektren zu distinkten Sekundärstrukturelementen, so dass deren Anteil in Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung ermittelt werden kann (Abbildung 5.4). Da die Spektrensätze innerhalb einer Cosolvensreihe simultan (anstatt jeweils individuell) analysiert wurden, weist die Sekundärstruktur-Zusammensetzung in Cosolvens-freier Lösung kleinere Variationen auf. Im Durchschnitt liefert die simultane Analyse der Spektrensätze einen α -helikalen Anteil von $(44 \pm 3)\%$, $(27 \pm 3)\%$ β -Strangbereiche, $(5 \pm 1)\%$ Schleifen und einen verbleibenden Anteil von $(27 \pm 3)\%$ in Zufallskonformation. Um diese Ergebnisse zu validieren, wurden Vergleichswerte aus der veröffentlichten Kristallstruktur von Insulin bei pH 2 herangezogen [Whittingham 2002]. Danach umfassen die drei α -helikalen Segmente (A1-A8, A12-A19 und B9-B19) rund 50% und das Dimer-spezifische β -Faltblatt (B24-B28) 10% der gesamten Sekundärstruktur. Weiterhin bilden die Sequenzen B6-B9 und B20-B23 zwei β -Schleifen (zusammen 16%), und eine zusätzliche Orientierungsänderung innerhalb der Polypeptidkette tritt zwischen Position A9 und A12 auf (8%). Somit verbleiben 16% der Struktur in Zufallskonformation. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte α -helikale Anteil stimmt recht gut mit dem auf der Basis der Kristallstruktur ermittelten Anteil

überein, wohingegen im Rahmen der CCA-Analyse der β -Stranganteil signifikant überschätzt und der Anteil von Schleifen unterschätzt wird. Allerdings wird generell beobachtet, dass die Abschätzung von β -Strang- und Schleifensegmenten auf der Basis des CCA-Algorithmus häufig ungenauer als mit anderen Analyseverfahren erfolgt, während der Algorithmus in der Abschätzung α -helikaler Bereiche anderen Verfahren überlegen ist [Greenfield 1996]. Der im Rahmen der CCA-Analyse, im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Kristallstruktur, ermittelte höhere Anteil von Zufallskonformationen spiegelt wahrscheinlich die höhere Segmentmobilität an den Kettenenden (A21, B1-B5 und B29-B30) sowie die größere Flexibilität des Monomers in Lösung wider [Dong 2003], [Hua 2004].

Im Gegensatz zur Zugabe von Glycerol, die die Konformation des nativen Proteins nicht beeinflusst, ruft die Zugabe schon kleiner Mengen (5 Gew.%) von EtOH und TFE deutliche Konformationsänderungen des Proteins hervor. Diese äußern sich - vor allem oberhalb von 15 Gew.% - in einer drastischen Abnahme bis zum Verlust des β -Stranggehaltes, wobei gleichzeitig der Anteil von Zufallskonformationen mit steigendem Alkoholgehalt bevorzugt wird. Der Verlust von β -Strangbereichen resultiert vermutlich aus einer Destabilisierung der nativen intermolekularen Kontakte im Bereich des Peptidsegments B24-B28, das maßgeblich an der Ausbildung des Dimer-spezifischen β -Faltblattes an der Monomer-Monomer-Grenzfläche beteiligt ist [Whittingham 2002], [Zhang 2002]. Diese Beobachtung korreliert sowohl mit der Abnahme des CD-Signals im nahen UV als auch der Abnahme des Stokes-Radius des Proteins in 20 Gew.% EtOH und TFE und stützt die Annahme, dass moderate Konzentrationen der beiden Alkohole (15-20 Gew.%) die Dissoziation des Dimers begünstigen. Darüber hinaus wird in beiden Fällen oberhalb von 15 Gew.% des Cosolvens eine leichte Zunahme des Anteils α -helikaler Bereiche beobachtet, während der Anteil von Schleifensegmenten im Wesentlichen unverändert bleibt. Demzufolge zeichnet sich das monomere Protein bei höheren Alkoholkonzentrationen durch ein höheres Ausmaß an Unordnung bei substantiellem Erhalt α -helikaler Bereiche aus.

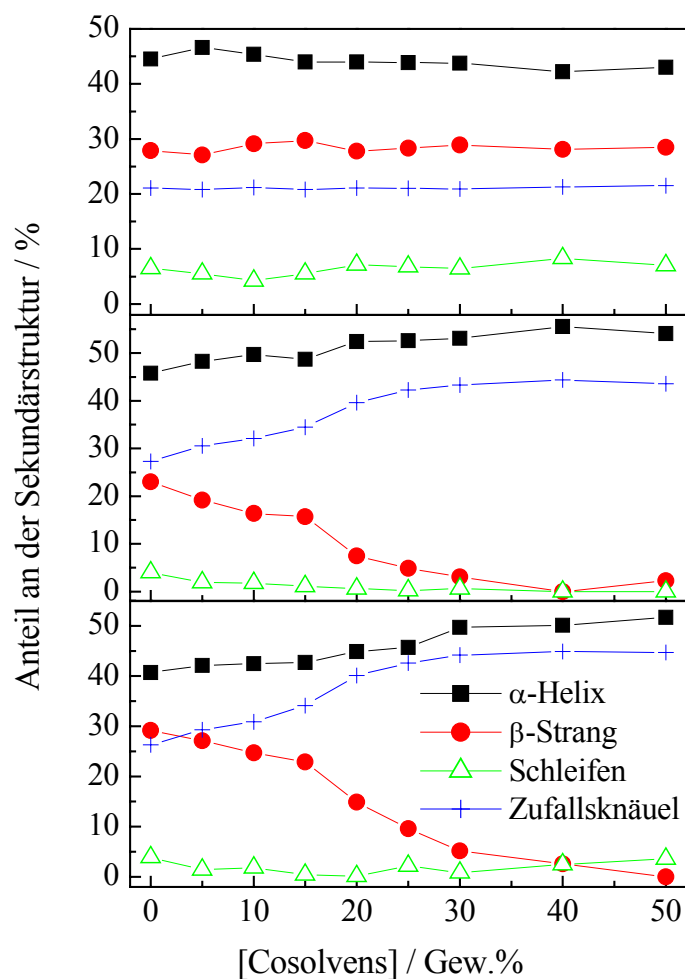


Abbildung 5.4: Sekundärstruktur-Zusammensetzung von 0,25 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 20 °C als Funktion der Konzentration von Glycerol (oben), EtOH (mittig) und TFE (unten).

5.1.2 Einfluss von Cosolventien auf die Aggregationskinetik

5.1.2.1 Rotationsdynamik des Proteins

Auf der Basis der Informationen über den Cosolvens-abhängigen Assoziationsgrad und die Konformation von Insulin bei Raumtemperatur (im prä-aggregierten Zustand), kann die Aggregationskinetik des Proteins bei erhöhten Temperaturen analysiert und interpretiert werden. Insbesondere die frühe Phase der Aggregation, über die bisher wenig bekannt ist, ist hierbei von wissenschaftlichem Interesse. In dieser Phase bilden sich bevorzugt nicht-native oligomere Aggregationskeime, die unter der Annahme eines

Keimbildungs-abhängigen Aggregationsprozesses den weiteren Aggregationsverlauf maßgeblich determinieren [Harper 1997]. Die zunehmende Größe oligomerer Proteinassoziate im frühen Stadium der Aggregation geht in der Regel mit einer deutlich abnehmenden Rotationsdynamik einher und lässt sich daher zeitabhängig anhand von Fluoreszenzanisotropiemessungen untersuchen. Werden diese in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration durchgeführt, können wertvolle mechanistische Informationen über den Aggregationsprozess erhalten werden.

Bei 50 °C wurde die Anisotropie von Alexa 488 markiertem Insulin bei verschiedenen Proteinkonzentrationen in ausgewählten Cosolvenssystemen zeitabhängig aufgenommen und auf Grundlage von Gleichung (4.10) analysiert. In Abbildung 5.5 ist die korrespondierende anfängliche zeitliche Entwicklung des scheinbaren hydrodynamischen Volumens des Proteins in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 dargestellt. Sowohl die anfängliche Größe der Insulinassoziate als auch die Bildungsgeschwindigkeit früher Aggregate weisen eine signifikante, Cosolvensmodulierte, Abhängigkeit von der Proteinkonzentration auf. In allen untersuchten Fällen nimmt das anfängliche scheinbare hydrodynamische Volumen der Assoziate mit steigender Proteinkonzentration zu. Diese Beobachtung lässt sich unter der Annahme eines reversiblen Gleichgewichtes zwischen Insulinmonomeren und höheren Oligomeren (Dimeren, Tetrameren und Hexameren) zu Beginn des Aggregationsprozesses erklären, da nach dem Massenwirkungsgesetz eine Erhöhung der Proteinkonzentration mit einer Erhöhung der Konzentration höherer Oligomere einher gehen sollte. Darüber hinaus deutet in allen untersuchten Fällen das, im Vergleich zur Situation bei 20 °C, etwas geringere scheinbare hydrodynamische Volumen der Assoziate auf eine temperatur-induzierte Dissoziation höherer Insulinoligomere hin.

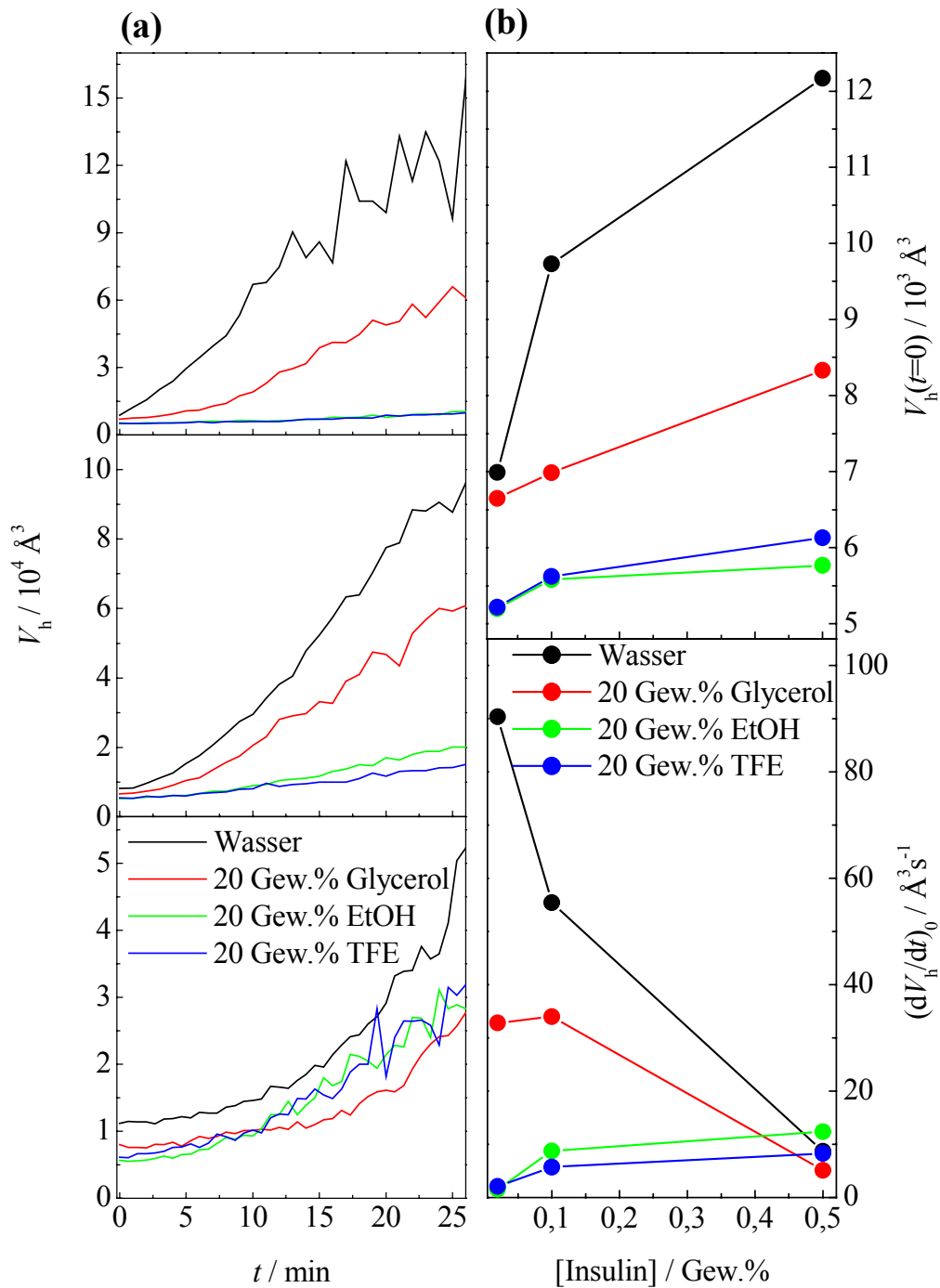


Abbildung 5.5: (a) Zeitliche Entwicklung des scheinbaren hydrodynamischen Volumens von Insulinaggregaten in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 50 °C für 0,02 Gew.% (oben), 0,1 Gew.% (mittig) und 0,5 Gew.% Insulin (unten). (b) Konzentrationsabhängigkeit der ermittelten scheinbaren hydrodynamischen Volumina zu Beginn der Aggregation (oben) und der anfänglichen zeitlichen Volumenzunahme (unten).

Die Konzentrationsabhängigkeit der anfänglichen Assoziatgröße ist in Wasser und 20 Gew.% Glycerol sehr stark, in 20 Gew.% EtOH und TFE dagegen nur schwach ausgeprägt. In Wasser und 20 Gew.% Glycerol stimmt der Wert für das scheinbare hydrodynamische Volumen des Proteins bei 0,02 Gew.% gut mit dem für das Monomer vorhergesagte überein und nähert sich in rein wässriger Lösung mit steigender Proteinkonzentration dem Wert für das Dimer an. In 20 Gew.% Glycerol erscheint das Protein hingegen auch bei 0,5 Gew.% Insulin kleiner als für das Dimer zu erwarten wäre, was vermutlich, wie bereits bei 20 °C beobachtet, einer Kompaktisierung des Dimers infolge stärkerer Hydratisierung zugeschrieben werden kann. Auf der anderen Seite liegt der Wert für das anfängliche scheinbare hydrodynamische Volumen des Proteins bei 0,02 Gew.% Insulin in 20 Gew.% EtOH und TFE etwa 20% unter dem Wert, der bei 20 °C für das Monomer beobachtet wird, und nimmt erst bei 0,5 Gew.% Insulin den Wert für das Monomer an. Wahrscheinlich resultiert die scheinbare Abnahme der Monomergröße bei 50 °C aus einer thermisch induzierten Aktivierung lokaler Rotationsmoden des Fluorophors, was zusätzlich zur globalen Rotationsbewegung des Proteins zu einer Fluoreszenzdepolarisation führen sollte [Lakowicz 1999]. Zudem deuten die Spektren im fernen UV bei erhöhter Temperatur darauf hin dass EtOH und TFE eine zunehmende Flexibilität innerhalb des Monomers begünstigen (siehe Kapitel 1.1.2.3). Demnach ist das Modell der isotropen ungehinderten Rotation, in dem der Fluorophor keine von der Proteinrotation entkoppelten Rotationsmoden aufweist, zur Beschreibung der Fluoreszenzdepolarisation an dieser Stelle nur begrenzt aussagekräftig.

Die anfängliche zeitliche Größenzunahme des scheinbaren hydrodynamischen Volumens, $(dV_h/dt)_0$, als empirisches Maß für die anfängliche Aggregationsgeschwindigkeit, weist eine zur Proteinkonzentration inverse Korrelation in rein wässriger Lösung und in 20 Gew.% Glycerol auf. Auf der Basis eines nukleationsabhängigen Aggregationsmodells finden zu Beginn der Aggregation vor allem Assoziationsprozesse statt, in denen aus Proteinmonomeren reversibel nicht-native, oligomere Aggregationskeime gebildet werden [Harper 1997]. Demzufolge sinkt in Wasser und 20 Gew.% Glycerol die Keimbildungsgeschwindigkeit mit steigender Proteinkonzentration. Darüber hinaus verläuft die Keimbildung in 20 Gew.% Glycerol signifikant langsamer als in Abwesenheit des Cosolvens. Diese Beobachtungen lassen

sich mechanistisch unter Berücksichtigung des, der Keimbildung vorgelagerten, Gleichgewichtes zwischen Monomer und höheren Oligomeren (bevorzugt Dimeren) erklären. Da dieses Gleichgewicht in Wasser und 20 Gew.% Glycerol weit auf Seiten des Dimers liegt, ist synonym die Bildungsgeschwindigkeit des Monomers gegenüber der des Dimers klein. Mit zunehmender Proteinkonzentration wird darüber hinaus die Bildung von Dimeren favorisiert und der Anteil von Monomeren, die in einer Parallelreaktion zu Aggregationskeimen oligomerisieren, vermindert. Somit inhibieren steigende Proteinkonzentrationen den Netto-Keimbildungsprozess unter Dimerstabilisierenden Lösungsmittelbedingungen, und die Dissoziation des Dimers kann den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Netto-Keimbildungsgeschwindigkeit darstellen. Eine ähnliche inverse Konzentrationsabhängigkeit der Aggregationsgeschwindigkeit wurde auch für die Aggregation von Insulin bei neutralem pH-Wert in wässriger Lösung beobachtet, bei der die Dissoziation des Hexamers als geschwindigkeitsbestimmender Schritt identifiziert wurde [Ahmad 2003].

Auf der anderen Seite ist die anfängliche Bildungsgeschwindigkeit von Oligomeren in 20 Gew.% EtOH und TFE bei 0,02 Gew.% Insulin kleiner als in Wasser oder 20 Gew.% Glycerol und wächst, wie im Allgemeinen für eine (mindestens bimolekulare) Aggregationsreaktion zu erwarten ist, mit steigender Proteinkonzentration. Die Tendenz der beiden Alkohole, bei moderaten Konzentrationen höhere Proteinassoziate zu dissoziieren (vgl. Kapitel 5.1.1.1 und 5.1.1.2), ist vermutlich verantwortlich für die geringere anfängliche Netto-Aggregationsgeschwindigkeit.

5.1.2.2 Aggregationskinetik des Proteins: ThT-Assay

In Ergänzung zur Untersuchung der Fluoreszenzdepolarisation, mit deren Hilfe vor allem der anfängliche Aggregationsprozess charakterisiert werden kann, liefert der ThT-Assay auch Informationen über spätere Aggregationsphasen, in denen sich reife Amyloidfibrillen entwickeln, so dass der gesamte Aggregationsprozess „in Echtzeit“ spektroskopisch verfolgt werden kann. Die zeitliche Entwicklung der Amyloidbildung wurde bei fester Insulinkonzentration (0,5 Gew.%) und verschiedenen Cosolvenskonzentrationen (0-40 Gew.%) bei 50 °C untersucht. In Abbildung 5.6 sind die aus den normierten ThT-Fluoreszenzdaten ermittelten, empirischen kinetischen Parameter (r_{\max} und lag-Zeit) für alle untersuchten Cosolvenssysteme dargestellt. Die

zugehörige zeitliche Entwicklung der ThT-Fluoreszenz findet sich im Anhang in Abbildung 7.3.

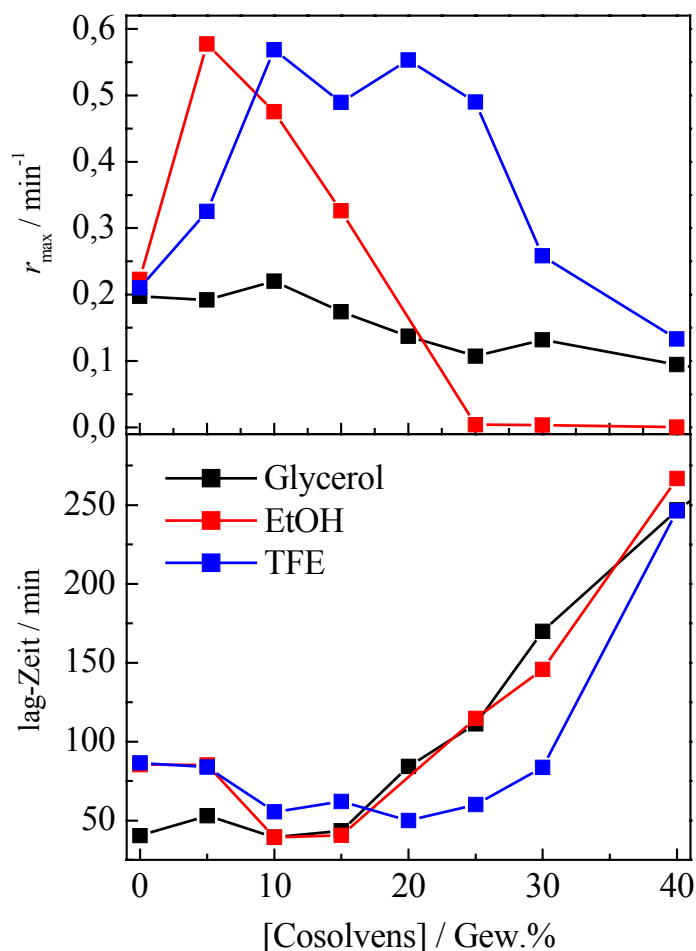


Abbildung 5.6: Abhängigkeit der, aus den normierten ThT-Fluoreszenzdaten ermittelten, empirischen kinetischen Parameter für die Aggregation von 0,5 Gew.% Insulin von der Cosolvenskonzentration in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 50 °C.

Die ThT-Emissionsprofile weisen, für einen nukleationsabhängigen Aggregationsmechanismus typische, Charakteristika auf [Harper 1997]: Nach einer lag-Phase, in der sich Aggregationskeime bilden, die nur eine schwache ThT-Emission hervorrufen, steigt die Fluoreszenzintensität sigmoidal bis zu einem Plateauwert an. Der sigmoidale Anstieg der Fluoreszenzintensität korreliert mit der Bildung und dem Wachstum reifer Amyloidaggregate bis zu einem quasi-stationären Zustand. Trotz des sehr komplexen Aggregationsmechanismus wurde ein relativ simples sigmoidales

Modell zur Auswertung der Daten gewählt, um die Aggregationskinetik des Proteins in verschiedenen Cosolvenssystemen zumindest phänomenologisch untereinander vergleichen zu können [Nielsen 2001a]. Anzumerken sind die unterschiedlichen Werte für die lag-Zeiten in Cosolvens-freien wässrigen Lösungen, die vermutlich auf der Verwendung verschiedener Protein-Chargen für die Untersuchungen in Glycerol einerseits und EtOH bzw. TFE andererseits zurückzuführen sind. Lag-Zeiten werden in der Regel stark von bereits in kleinen Mengen vorhandenen, fibrillären Keimen in den Proteinpräparationen beeinflusst, die von Charge zu Charge variieren können.

Die Zugabe von Glycerolkonzentrationen bis zu ca. 15 Gew.% beeinflusst die Dauer der lag-Phase kaum, bei höheren Konzentrationen nimmt diese jedoch annähernd linear mit der Glycerolkonzentration zu. Gleichzeitig wird im selben Konzentrationsbereich eine lineare Abnahme der scheinbaren maximalen Wachstumsrate beobachtet, während die maximale Fluoreszenzintensität bei vollständiger Aggregation (siehe Abbildung 7.3 im Anhang), näherungsweise konstant bleibt. Zusammen genommen deuten diese Daten darauf hin, dass über den gesamten Konzentrationsbereich der Fibrillbildungsprozess progressiv mit der Glycerolkonzentration verlangsamt wird.

Auf der anderen Seite wird die Dauer der lag-Phase bei Zugabe moderater Konzentrationen von EtOH und TFE (ca. 15-20 Gew.%) auf etwa die Hälfte reduziert, steigt aber bei weiterer Alkoholzugabe drastisch, nicht-linear an. In analoger Weise steigt zunächst die scheinbare maximale Wachstumsrate bis zu einer Konzentration von 5 Gew.% (in EtOH) bzw. 10-15 Gew.% (in TFE) an und fällt bei weiterer Cosolvenszugabe signifikant ab, so dass in beiden Fällen eine glockenförmige Konzentrationsabhängigkeit der kinetischen Parameter resultiert. Darüber hinaus wird ein ähnlicher Trend für die maximale Fluoreszenzintensität bei vollständiger Aggregation beobachtet, die ebenfalls eine näherungsweise glockenförmige Abhängigkeit von der Cosolvenskonzentration aufweist. Insbesondere scheinen die vollständig ausgebildeten Aggregate bei höheren EtOH- bzw. TFE-Konzentrationen (> 15 bzw. 30 Gew.%) eine signifikant geringere Affinität für ThT aufzuweisen, da in diesem Konzentrationsbereich die Werte für die oberen Fluoreszenzplateaus stark abnehmen. Die Annahme, dass diesem Effekt vor allem eine unterschiedliche Struktur

der vollständig ausgebildeten Insulinaggregate zugrunde liegt, wird durch eine Analyse der CD-Spektren im fernen UV (siehe Kapitel 5.1.2.3) bestätigt.

Zusammenfassend deutet die Analyse der zeitlichen ThT-Emissionsprofile auf eine Aggregationsbeschleunigung bei kleinen und eine Aggregationsverlangsamung bei höheren (> ca. 20 Gew.%) Konzentrationen der beiden Monoalkohole hin.

5.1.2.3 Sekundärstruktur des Proteins

Die Analyse von zeitabhängig aufgenommenen CD-Spektren im fernen UV ermöglicht Aussagen über strukturelle Modifikationen von Insulinaggregaten während ihrer Bildung unter unterschiedlichen Lösungsmittelbedingungen bei erhöhter Temperatur. Im Gegensatz zum ThT-Assay, mit dem vor allem die Bildung von fibrillären Proteinaggregaten zeitlich verfolgt werden kann, erlaubt eine Analyse der CD-Spektren die Charakterisierung der Sekundärstruktur-Zusammensetzung der gesamten Aggregatpopulation, einschließlich amorpher Aggregate. In den Abbildungen 5.7-5.9 ist die zeitliche Veränderung der Sekundärstruktur-Zusammensetzung von Insulin im Verlaufe der Aggregation bei 61 °C dokumentiert.

In Cosolvens-freier, wässriger Lösung beträgt der anfängliche α -helikale Anteil ungefähr 33%, der β -Strang-Anteil 16%, der Anteil von Schleifen 18%, und der verbleibende Anteil in Zufallskonformation umfasst ca. 32%. Im Vergleich zur Sekundärstruktur-Zusammensetzung bei 20 °C ist eine Zunahme des Anteils weniger strukturierter Konformationen (Schleifen und Zufallsknäuel) auf Kosten α -helikaler und Bereichen in β -Strang-Konformation zu verzeichnen, deren Anteil jeweils um 10% geringer ausfällt. In Übereinstimmung mit Beobachtungen von Hua et al. veranschaulichen diese Ergebnisse, dass die Bildung von oligomeren Aggregationskeimen von nicht-nativen Insulinmolekülen initiiert wird, die im Vergleich zum nativen Protein ein höheres Ausmaß an Flexibilität bei gleichzeitig vermindertem Anteil α -helikaler Konformation aufweisen [Hua 2004]. Eine solche Konformation entspricht wahrscheinlich der Konformation eines Faltungsintermediates von Insulin, dem eine Schlüsselrolle im Aggregationsprozess zugeschrieben wird [Ahmad 2003], [Ahmad 2004].

In Gegenwart von EtOH und TFE (bis zu jeweils 30 Gew.%), vor allem zwischen 5 Gew.% und 10 Gew.% der beiden Cosolventien, steigt der anfängliche Anteil von Zufallskonformationen um weitere 10-15%, insbesondere auf Kosten des Anteils von β -Strang-Konformationen. Bei Zusatz von Glycerol bleibt der Anteil von Zufallskonformationen im Wesentlichen unverändert, und β -Strang-Anteil wird nur leicht vermindert. Unabhängig von der Art des Cosolvens führt die Zugabe von Glycerol, EtOH und TFE bis zu 30 Gew.% zu einer einheitlichen Erhöhung des α -helikalen Anteils um 10% bei gleichzeitiger Verminderung des Anteils von Schleifensegmenten um denselben Betrag. Vergleichend kann festgehalten werden, dass in EtOH und TFE zu Beginn der Aggregation nicht-native Konformationsänderungen auf der Ebene der Sekundärstruktur des Proteins begünstigt werden, während auf der anderen Seite die Zugabe von Glycerol die native oder nativ ähnliche Konformationen des Proteins stabilisiert.

Bei längerer Inkubation des Proteins bei 61 °C ist ein dramatischer Verlust des Anteils α -helikaler Konformation bei simultaner drastischer Erhöhung des β -Strang-Anteils zu verzeichnen, der sich in einer Abnahme des CD-Signals sowie einer Verschiebung des spektralen Minimums von $\lambda = 208$ nm zu $\lambda = 220$ nm hin äußert. Die zeitliche Entwicklung beider Sekundärstruktur motive weist, ebenso wie die ThT-Emission, einen sigmoidalen Verlauf aus, der für einen nukleationsabhängigen Aggregationsmechanismus charakteristisch ist. Darüber hinaus verhalten sich beide Entwicklungen weitgehend spiegelbildlich und repräsentieren somit eine kooperative Umwandlung des Proteins von α -helikaler in β -Faltblattkonformation. Bei Zugabe von etwa 5-10% EtOH bzw. TFE läuft diese Umwandlung im Vergleich zur Umwandlung in rein wässriger Lösung beschleunigt ab, während bei weiterer Konzentrationserhöhung der Aggregationsprozess verlangsamt wird. Im Gegensatz dazu ist bei Zugabe von Glycerol über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ausschließlich eine fortschreitende Inhibierung der Aggregation zu beobachten. Interessanter Weise durchläuft der zusammengenommene Anteil weniger strukturierter Konformationen (Zufallsknäuel + Schleifen; nicht explizit dargestellt) in der frühen Aggregationsphase ein deutliches Maximum für alle untersuchten Glycerolkonzentrationen, bei Zusatz von EtOH bzw. TFE hingegen nur bis zur Zugabe von 5 Gew.%. Diese Beobachtung deutet

darauf hin, dass unter Lösungsmittelbedingungen, die die native Konformation des Proteins stabilisieren, eine erhebliche anfängliche Reorganisation von einer kompakten zu weniger geordneten Konformationen erforderlich ist, um Aggregationskeime ausbilden zu können. Demzufolge muss unter solchen Bedingungen das Protein zur Keimbildung in substantiellem Ausmaß entfalten [Uversky 2004].

Abgesehen von der Aggregationskinetik unterscheiden sich die resultierenden Aggregate, insbesondere hinsichtlich des Anteils von Zufallskonformationen, strukturell deutlich von denen in Cosolvens-freier Lösung. Zwar nimmt in allen Fällen der Anteil von Zufallskonformationen mit fortschreitender Aggregation ab, jedoch liegt deren Anteil in der vollständig aggregierten Probe mit jeweils etwa 45% (in 30 Gew.% EtOH bzw. TFE) deutlich über dem Wert in Cosolvens-freier Lösung (ca. 17%) und in 30 Gew.% Glycerol (ca. 32%). Der Anteil von α -helikalen Segmenten an der Sekundärstruktur vollständig aggregierten Proteins ist bei Zugabe von EtOH und TFE leicht erhöht und bei Zugabe von Glycerol praktisch konstant, wohingegen, wenn überhaupt, der β -Strang-Anteil mit steigender Cosolvenskonzentration leicht abnimmt. Für den Anteil von Schleifensegmenten ist eine scheinbar unsystematische Variation mit der Cosolvenskonzentration auszumachen, wenngleich solche Segmente in rein wässriger Lösung einen etwas höheren Anteil ausmachen. Dennoch offenbaren sich Unterschiede im zeitabhängigen Trend dieses Anteils, nämlich eine zeitlich Zunahme in Glycerol- und eine Abnahme in EtOH- bzw. TFE-enthaltenden Lösungen. Im Wesentlichen lässt sich festhalten, dass die Insulinaggregate trotz des gemeinsamen überwiegenden Anteils in β -Faltblattkonformation bei den höchsten untersuchten Cosolvenskonzentrationen in EtOH und TFE ein erheblich höheres Ausmaß an struktureller Unordnung aufweisen.

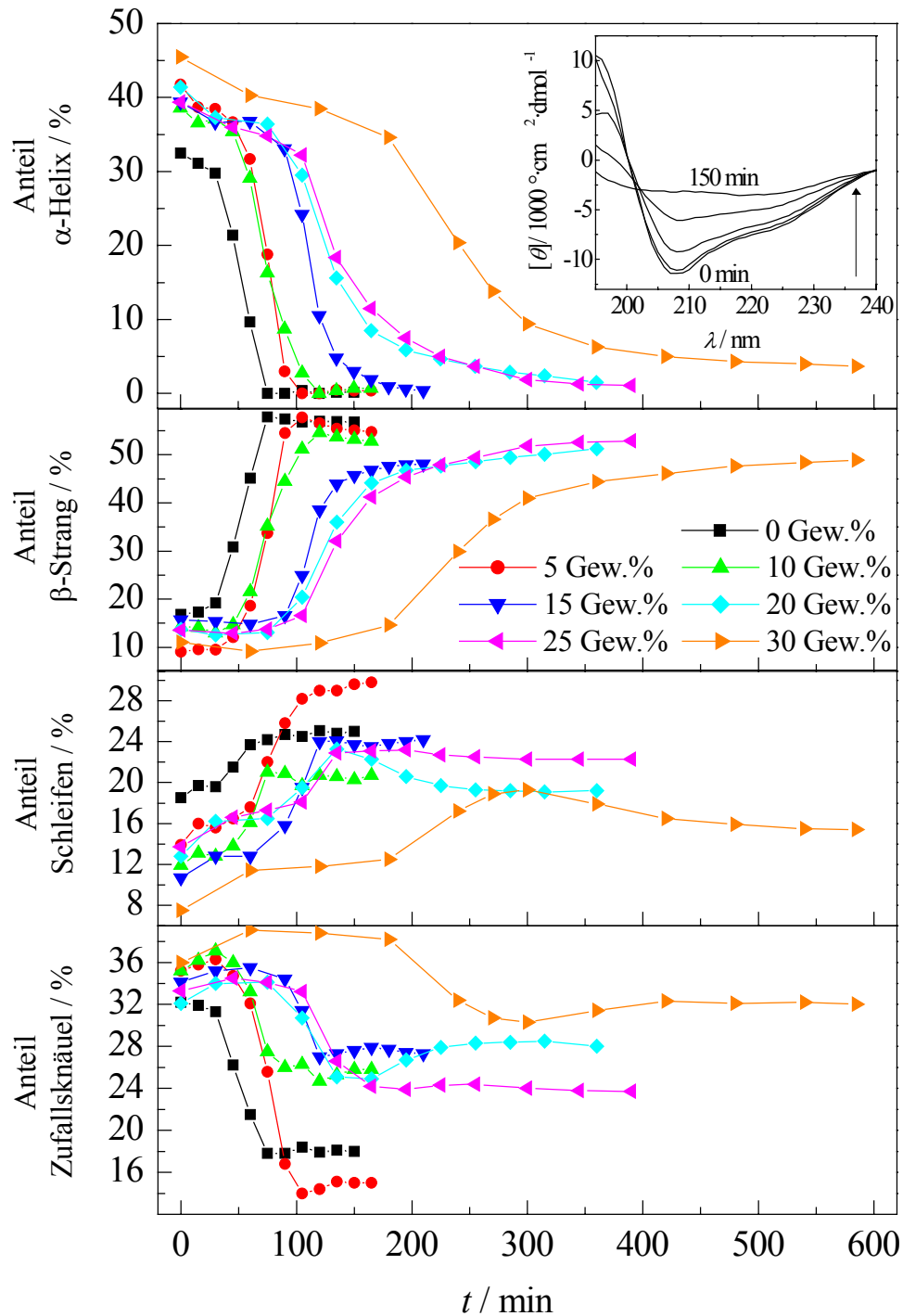


Abbildung 5.7: Zeitliche Entwicklung der Sekundärstruktur-Zusammensetzung von 0,25 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 61 °C und verschiedenen Glycerolkonzentrationen. Inset: Repräsentative, zeitabhängig aufgenommene, CD-Spektren im fernen UV für Insulin in Cosolvens-freier, wässriger Lösung.

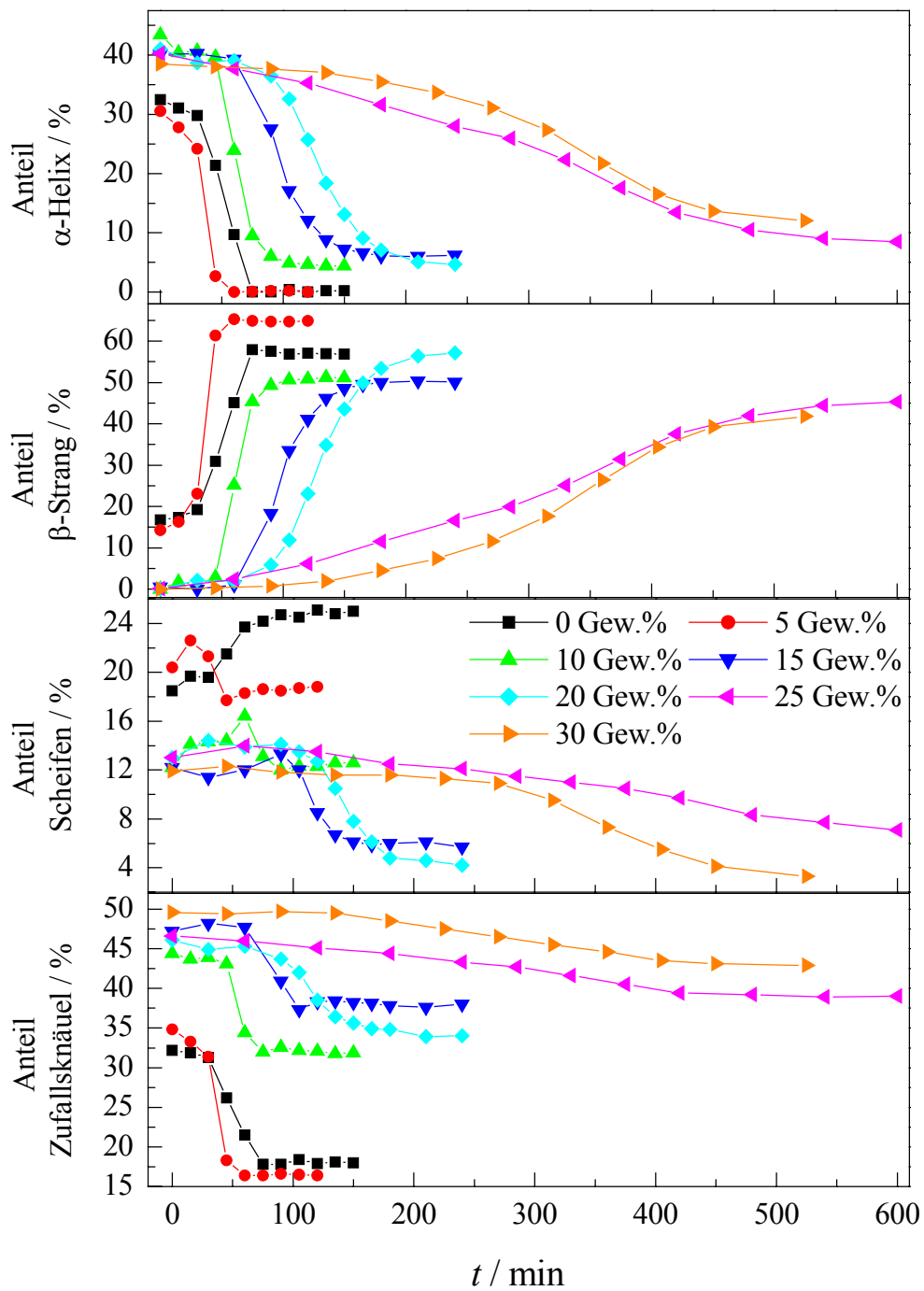


Abbildung 5.8: Zeitliche Entwicklung der Sekundärstruktur-Zusammensetzung von 0,25 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 61 °C und verschiedenen EtOH-Konzentrationen.

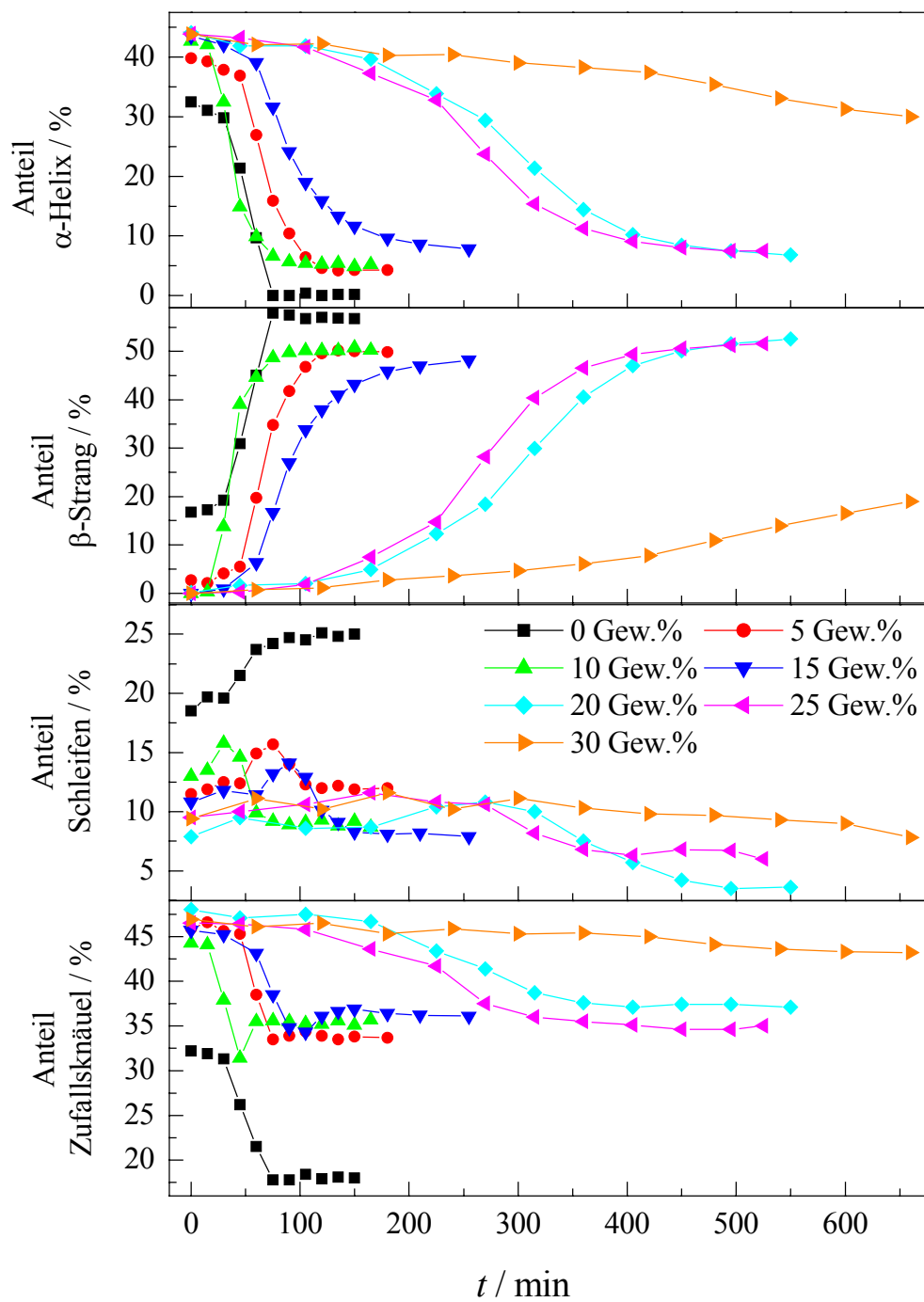


Abbildung 5.9: Zeitliche Entwicklung der Sekundärstruktur-Zusammensetzung von 0,25 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 61 °C und verschiedenen TFE-Konzentrationen.

5.1.3 Einfluss von Cosolventien auf die Oberflächeneigenschaften vollständig ausgebildeter Insulinaggregate

Da der Zusatz verschiedener Cosolventien während der Proteinaggregation die Sekundärstruktur der resultierenden Insulinaggregate in unterschiedlicher Weise moduliert, erscheint die Vermutung gerechtfertigt, dass sich solche Sekundärstrukturvariationen auch in unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften der vollständig ausgebildeten Aggregate widerspiegeln [Cardamone 1992]. Zur Unterstützung dieser Annahme wurde das Bindungsverhalten von ANS, als hydrophobem Liganden, hinsichtlich seiner Wechselwirkung mit der ihm zugänglichen, lösungsmittlexponierten, Oberfläche der verschiedenen Aggregatformen untersucht.

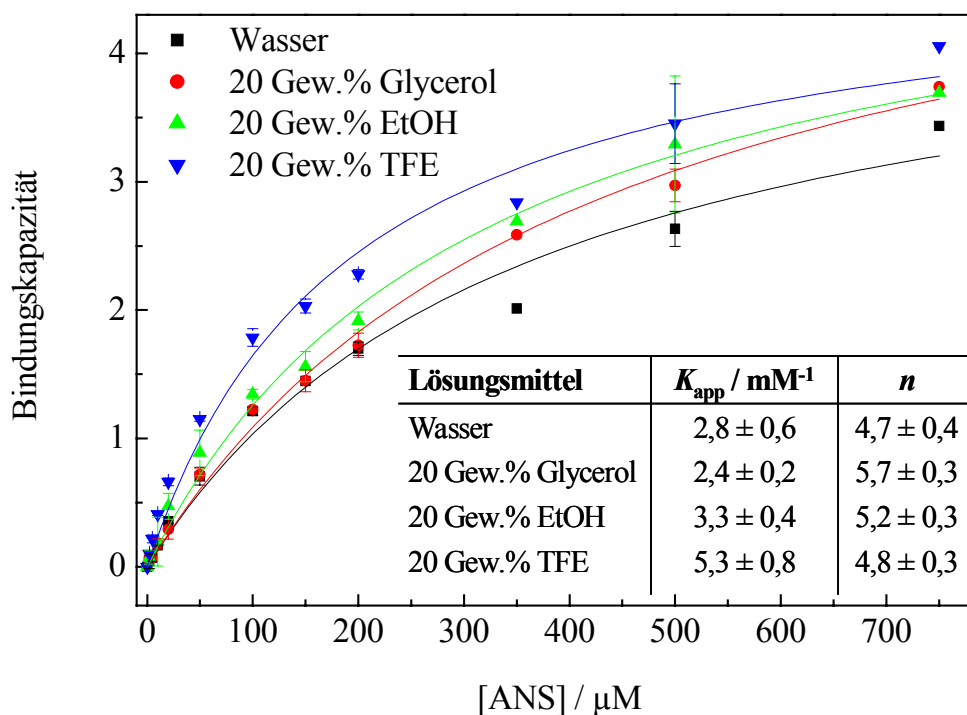


Abbildung 5.10: Isothermen für die Bindung von ANS an 0,01 Gew.% vollständig aggregiertes Insulin, das für jeweils 4 Tage bei 50 °C in 0,1 M NaCl, pH 1,9 unter verschiedenen Lösungsmittelbedingungen inkubiert wurde. Die Fehlerbalken stellen statistische Fehler aus zwei unabhängigen Messreihen dar, und die durchgängigen Linien sind das Ergebnis einer Datenanpassung an ein Langmuir-Modell für die Ligandenbindung, gemäß Gleichung (4.15). Inset: Aus der Langmuir-Analyse erhaltene Bindungsparameter.

Dazu wurden nach vollständiger Aggregation unter verschiedenen Lösungsmittelbedingungen bei 50 °C die Proteinaggregate in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 resuspendiert und mit ANS titriert. Die Bindungskapazität der verschiedenen Aggregate für ANS wurde UV-spektrometrisch ermittelt und auf der Grundlage eines Langmuir-Modells (vgl. Gleichung (4.15)) interpretiert. Die Wahl eines solchen Modells impliziert zwar in stark vereinfachender Weise die Anwesenheit unabhängiger, gleichwertiger Bindungsstellen für ANS, erlaubt aber dennoch eine „semiquantitative“ Beschreibung der Bindungscharakteristika. In Abbildung 5.10 sind die Ergebnisse der ANS-Titration von Insulinaggregaten aus rein wässriger sowie jeweils 20 Gew.% Glycerol-, EtOH- oder TFE-enthaltender Lösung dargestellt. Die Bindungsisothermen weisen in allen Fällen ein Sättigungsverhalten auf, was eine begrenzte Anzahl von Ligandenbindungsstellen ($n = 5-6$) pro mol Aggregat auf der Proteinoberfläche impliziert, die näherungsweise unabhängig von der Art des jeweiligen Aggregates ist. Demnach scheint in allen Fällen ein ähnlicher Anteil der Aggregatoberfläche für die Ligandenbindung zugänglich zu sein. Dennoch offenbaren sich Unterschiede in den scheinbaren Bindungskonstanten, die für Aggregate aus 20 Gew.% EtOH etwas höher und für die aus 20 Gew.% Glycerol etwas niedriger als für Aggregate aus rein wässriger Lösung sind. Während die Signifikanz dieser kleineren Unterschiede fraglich bleibt, weist der ermittelte Wert für die scheinbare Bindungskonstante im Falle von 20 Gew.% TFE auf eine deutlich höhere Affinität des Farbstoffs für die Proteinoberfläche hin. Es ist bekannt, dass ANS sowohl mit hydrophoben, exponierten Proteinsegmenten als auch elektrostatisch mit positiv geladenen Proteinbereichen wechselwirken kann, wobei die Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen mit der positiven Nettoladung des jeweiligen Proteins zu korrelieren scheint [Slavik 1982], [Matulis 1998]. Da das ANS-Bindungsverhalten für alle Aggregate bei demselben pH-Wert untersucht wurde, weisen diese wahrscheinlich eine ähnliche positive Nettoladung auf (die Nettoladung von nativem Insulin bei pH 2 beträgt +6 [Strazza 1985]). Zudem sollte die Anwesenheit von 0,1 M NaCl zu einer Abschirmung attraktiver elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand führen, weshalb die stärkere Wechselwirkung von ANS mit Insulinaggregaten aus 20 Gew.% TFE wahrscheinlich vornehmlich auf eine erhöhte Oberflächenhydrophobizität der Aggregate zurückzuführen ist. Unter Berücksichtigung des signifikanten Anstiegs des Anteils von Zufallskonformationen bei EtOH- und TFE-

Konzentrationen $> 15\text{-}20\text{ Gew.}\%$ ist die erhöhte Oberflächenhydrophobizität wahrscheinlich das Resultat der Exposition hydrophober Seitenketten, die sich im Anschluss an die Entfaltung im Aggregat ungeordnet zusammenlagern. Gestützt wird diese These durch morphologische AFM-Untersuchungen. Diese belegen, dass bei höheren EtOH- und TFE-Konzentrationen bevorzugt amorphe Agglomerate gebildet werden, wohingegen alle Aggregate in rein wässrigen und Glycerol-enthaltenden Lösungen ausschließlich eine fibrilläre Morphologie aufweisen [Grudzielanek 2005].

5.1.4 Diskussion der Wirkmechanismen verschiedener Cosolvenczusätze im Kontext der Aggregation von Insulin

Der diversifizierte Lösungsmiteleinfluss auf die strukturellen und kinetischen Charakteristika der Aggregation von Insulin kann auf der Basis der Fähigkeit verschiedener Cosolventien interpretiert werden, die freie Energie nativer und nicht-nativer Insulinspezies sowie die Energiebarrieren für deren wechselseitige Umwandlung zu modulieren. Eine Schlüsselrolle in der Diskussion alternativer Selbstassoziationswege scheint dabei der lösungsmittelabhängigen, konformellen Präferenz von Faltungsintermediaten des Proteins zuzukommen, die in der Regel thermodynamisch destabilisierten Zustände darstellen. Hochenergetische Intermediate in teilweise entfalteter Konformation können, z.B., durch eine Verringerung ihrer lösungsmittelzugänglichen Oberfläche, der Sättigung von freien, potentiellen Wasserstoffbrückenbindungsplätzen sowie der Ausbildung eines hydrophoben Kerns, thermodynamisch stabilisiert werden [Qu 1998], [Thirumalai 2003]. Dazu kommen zwei konkurrierende Strategien, nämlich die Faltung in die native Konformation oder die Aggregation, in Betracht [Dobson 1999a]. Die native Faltung und die Selbstassoziation nativer Insulinmonomere werden vor allem durch attraktive intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen, aber auch durch die Ausbildung eines β -Faltblattes an der Monomer-Monomer-Grenzfläche und der damit einhergehenden Abschirmung hydrophober Proteinbereiche in wässriger Lösung begünstigt. Glycerol als kosmotropes Cosolvens kann als Stabilisator solcher Konformationen angesehen werden, da durch die Dimerisierung die Ausschlusszone verkleinert wird [Timasheff 1993], [Timasheff 2002]. Die Zugabe von Glycerol erhöht progressiv sowohl die freie Energiebarriere zwischen Dimer und nativem Monomer als

auch zwischen nativem und teilweise entfaltetem Monomer. Da die Dissoziation des Dimers in Gegenwart von Glycerol offenbar den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Aggregationsprozesses darstellt, nimmt die Netto-Aggregationsgeschwindigkeit mit steigenden Glycerolkonzentrationen ab. Wird die Energiebarriere für die Dissoziation und teilweise Entfaltung bei höherer Temperatur jedoch überwunden, stellt die Fibrillbildung einen sehr effizienten Packungsmodus für exponierte hydrophobe Proteinbereiche des teilweise entfalteten Zustand dar. Vermutlich ist das Faltungsintermediat in Gegenwart höherer Glycerolkonzentrationen im Vergleich zu dem in rein wässriger Lösung etwas stärker strukturiert und kompakter [Ravindra 2003], was die Ausbildung wohldefinierter hydrophober Kontakte und spezifischer intermolekularer Wasserstoffbrücken im Zuge der Aggregation begünstigt. Ein damit einhergehender, wohldefinierter Packungsmodus offenbart sich morphologisch in der regulären, fibrillären Architektur der resultierenden Aggregate wider [Grudzielanek 2005].

Die Wirkung von EtOH und TFE sowohl als Aggregationsbeschleuniger (bei geringen Konzentrationen) als auch als Aggregationsinhibitoren (bei hohen Konzentrationen) kann, unter anderem, unter Berücksichtigung des nicht-monotonen physikochemischen Verhaltens der beiden Alkohole in wässriger Lösung erklärt werden. Bei geringen Konzentrationen liegen die Alkoholmoleküle einzeln dispergiert in Wasser vor. Es wurde beobachtet, dass beide Alkohole unter solchen Bedingungen die Wasserstruktur in kosmotroper Weise beeinflussen, eine Hydratisierung von Proteinen begünstigen sowie entfaltete Proteinkonformationen destabilisieren und die Proteinfaltung beschleunigen können [Walgers 1998], [Kentsis 1998], [Lu 1997]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten deuten allerdings darauf hin, dass vor allem die EtOH- und TFE-induzierte Dissoziation des Insulin-Dimers und, bei höheren Temperaturen, die vermehrte Bildung teilweise entfalteter Insulinmonomere bei geringen Alkoholkonzentrationen den Aggregationsprozess beschleunigen. Die teilweise entfalteten Monomere scheinen aufgrund günstiger Hydratisierung noch geordnete oligomere Aggregationskeime ausbilden zu können, die sich letztendlich zu Amyloidfibrillen entwickeln [Grudzielanek 2005]. Oberhalb kritischer Konzentrationen (z.B., für EtOH, bei 15 Gew.% [Cinelli 1997]) neigen beide Alkohole in wässriger Lösung dagegen zur Ausbildung von Mizell-ähnlichen Clustern. Für TFE wurde die

ausgeprägte Clusterbildung, aufgrund eines additiven Effekts der Fluoro-Substituenten, als eine Ursache für dessen Fähigkeit postuliert, strukturelle Änderungen, vor allem die Induktion helikaler Konformationen, in nativen Proteinen hervorzurufen [Hirota 1998], [Hong 1999]. Wie es scheint, wird die Proteinfaltung bei höheren Alkoholkonzentrationen jedoch hauptsächlich durch eine Abschwächung hydrophober Wechselwirkungen infolge einer verringerten Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels begünstigt [Thomas 1993], allerdings kann auch eine direkte Alkoholbindung an Proteine nicht ausgeschlossen werden [Bull 1978], [Fioroni 2002]. Thermodynamisch betrachtet, sollte eine bevorzugte Bindung von Alkoholen bei höheren Konzentrationen Insulinoligomere destabilisieren, und das Cosolvens sollte mit steigender Konzentration überwiegend chaotrope Eigenschaften aufweisen [Timasheff 1993], [Kentsis 1998], [Moelbert 2004]. Tatsächlich belegen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse der Fluoreszenzanisotropie- und CD-Spektroskopie-Untersuchungen im fernen UV eine Stabilisierung monomerer Insulinspezies, die ein erhöhtes Ausmaß an konformeller Unordnung bei aggregationsfördernden Temperaturen aufweisen. Mit steigenden Alkoholkonzentrationen ist eine Zunahme der Aktivierungsenergie für die Bildung oligomerer Aggregationskeime aus teilweise entfalteten Insulinspezies zu erwarten. Insbesondere sollte aufgrund der geringer werdenden Dielektrizitätskonstante, ϵ , des umgebenden Mediums (z.B., $\epsilon(\text{Wasser}) = 80,4$ und $\epsilon(\text{EtOH}) = 25,7$ bei $20\text{ }^\circ\text{C}$) die Annäherung positiv geladener Insulinmonomere erschwert werden, da die Debye-Abschirmung repulsiver elektrostatischer Wechselwirkungen durch den Alkoholzusatz verringert wird. Unter solchen Umständen kann, im Gegensatz zur Situation in Glycerol, die Keimbildung, und nicht die Dissoziation nativer Insulindimere, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Aggregation darstellen. Demzufolge sollte, wie für 20 Gew.% EtOH bzw. TFE beobachtet, die Netto-Aggregationsgeschwindigkeit mit steigender Proteinkonzentration zunehmen. Darüber hinaus begünstigt eine Annäherung der dielektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels an die des reinen Alkohols thermodynamisch die Exposition hydrophober Proteinsegmente im vollständig ausgebildeten Aggregat. Sehr wahrscheinlich resultieren die Insulinagglomerate, die bei hohen Alkoholkonzentrationen dominieren [Grudzielanek 2005], aus der unspezifischen Aggregation konformell hochgradig flexibler Faltungsintermediate mit einem hohen

Anteil exponierter hydrophober Bereiche. Sowohl die amorphe Natur solcher Agglomerate als auch das Ausbleiben einer ThT-positiven Fluoreszenz liefern tragkräftige Indizien dafür, dass diese anscheinend in einer, zur regulären Fibrillbildung konkurrierenden, Nebenreaktion gebildet werden. Abgesehen vom rein faltungstheoretischen Hintergrund, sind solche „off-pathway“-Aggregate in physiologischer Hinsicht äußerst interessant: Gegenüber kultivierten Zellen weisen amorphe Insulinaggregate aus 40 Gew.% EtOH eine ähnliche Toxizität auf wie fibrilläre Aggregate, die als eine Hauptursache für diverse Proteinfehlfaltungskrankheiten, wie z.B. Typ-2 Diabetes, diskutiert werden [A. Kapurniotu, Universitätsklinikum RWTH Aachen, persönliche Mitteilung].

5.2 Einfluss von Druck auf das Aggregationsverhalten von Insulin

Die Untersuchung des druckabhängigen Aggregationsverhaltens von Proteinen liefert, zusätzlich zu Informationen aus Cosolvens-abhängigen Untersuchungen, wertvolle Beiträge zum Verständnis der Hydratation und der Packung von Proteinspezies, die auf unterschiedlichen Aggregationspfaden gebildet werden. Darüber hinaus können durch eine Analyse der Aggregationskinetik unter Druck neue Einsichten in volumetrische Charakteristika der Übergangszustände zwischen den verschiedenen, am Aggregationsprozess beteiligten, Proteinspezies gewonnen werden.

In diesem Kapitel wird der Einfluss von Druck auf die Struktur von Insulin vor der Aggregation sowie auf die Aggregationskinetik des Proteins unter verschiedenen Lösungsmittelbedingungen dargelegt. Darüber hinaus soll die unterschiedliche Druckstabilität von Insulinaggregaten, die sich auf konkurrierenden Aggregationspfaden bilden, dokumentiert und diskutiert werden.

5.2.1 Druckeffekte im prä-aggregierten Zustand des Proteins

5.2.1.1 Rotationsdynamik des Proteins

In Kapitel 5.1 konnte bereits anhand von Fluoreszenzanisotropiemessungen gezeigt werden, dass der Zusatz von destabilisierenden Cosolventien, wie z. B. EtOH, die Dissoziation nativer, oligomerer Insulinspezies vor allem durch die Abschwächung

Dimer-stabilisierender hydrophober Wechselwirkungen begünstigt. Unter anderem bestimmt die damit einhergehende erhöhte Population monomerer Insulinspezies die empfindliche Balance zwischen alternativen Selbstassoziationspfaden des Proteins schon in der frühen Keimbildungsphase der Aggregation. Es ist bekannt, dass auch hohe Drücke die Dissoziation nativer Proteinoligomere fördern, doch können die zugrunde liegenden Mechanismen sich zum Teil erheblich von denen der Cosolvens-induzierten Dissoziation unterscheiden. Zur Untersuchung des Einflusses von Druck auf das Selbstassoziationsverhalten von Insulin im prä-aggregierten Zustand wurde die Fluoreszenzanisotropie von, mit Alexa 488 markiertem, Insulin in Gegenwart verschiedener EtOH-Konzentrationen in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 20 °C und zu Beginn der Aggregation bei 60 °C untersucht (die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzanisotropie bei 60 °C ist in Abbildung 7.4 im Anhang dargestellt). Unter Verwendung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von Alexa 488-markiertem Insulin (in Abbildung 7.5 im Anhang dargestellt) wurden nach Gleichung (4.10) die scheinbaren hydrodynamischen Volumina des Proteins als Funktion des Druckes berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.11 dargestellt. In allen Fällen führt die Zugabe von EtOH zu einer Abnahme des scheinbaren hydrodynamischen Volumens des Proteins, was der Dissoziation höherer Insulinoligomere, vor allem von Dimeren, zugeschrieben werden kann (vgl. Kapitel 5.1.1.1). Weiterhin nimmt die scheinbare Größe der Oligomere mit steigendem Druck ab. Demnach muss die Volumenänderung für die Dissoziation, ΔV_{diss} , negativ sein. Da sogar in 20 Gew.% EtOH eine druckinduzierte Abnahme des scheinbaren hydrodynamischen Volumens beobachtet wird, ist es möglich, dass bei der relativ hohen Proteinkonzentration von 0,5 Gew.% bei Atmosphärendruck bei dieser EtOH-Konzentration immer noch ein kleiner Anteil des Proteins als Dimer in Lösung vorliegt. Jedoch fällt die Volumenabnahme nur gering aus, so dass diese, z. T., auch durch eine leichte Volumenkontraktion von Monomeren infolge eines elastischen Druckeffektes erklärt werden könnte. Darüber hinaus ist eine druckabhängige gegenseitige Annäherung der Werte für das scheinbare hydrodynamische Volumen bei beiden Temperaturen festzustellen, was im Umkehrschluss die Vermutung nahe legt, dass Druck die Proteinassoziation in rein wässriger Lösung am stärksten beeinflusst. Schließlich ist das scheinbare Volumen des Proteins in allen untersuchten Lösungsmittelsystemen bei 60 °C geringer als bei 20 °C.

Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf eine thermisch induzierte Dissoziation oligomerer Insulinspezies aufgrund einer negativen Dissoziationsenthalpie, ΔH_{diss} , eventuell verbunden mit einer anschließenden teilweisen Entfaltung des Proteins, zurückzuführen. Allerdings kann auch ein verringerter Wert für die Fluoreszenzanisotropie, im Zuge einer thermischen Aktivierung lokaler Rotationsmoden des Fluorophors, als Ursache für die scheinbare Volumenabnahme nicht vollständig ausgeschlossen werden. Aufgrund des komplexen Gleichgewichtes zwischen Monomeren, Dimeren und eventuell höheren Oligomeren wird auf eine weitergehende, detaillierte thermodynamische Analyse des Dissoziationsverhaltens abgesehen.

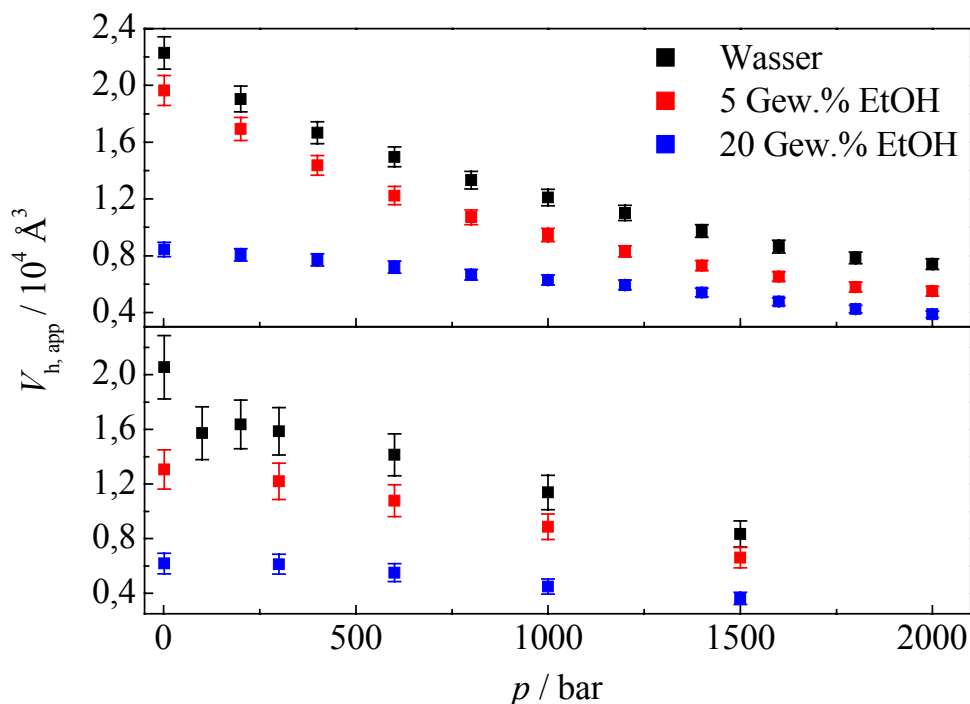


Abbildung 5.11: Druckabhängigkeit des scheinbaren hydrodynamischen Volumens von 0,5 Gew.% Alexa 488 markiertem Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei verschiedenen EtOH-Konzentrationen und 20 °C (oben) bzw. zu Beginn der Aggregation bei 60 °C (unten). Die Fehlerbalken stellen statistische Fehler aus zwei unabhängigen Anisotropiemessungen dar.

Eine druckinduzierte Dissoziation ist für eine Reihe nativer oligomerer Proteine gut dokumentiert, z.B. für das tetramere Transthyretin [Ferrão-Gonzales 2000]. Es ist

relativ gesichert, dass die Eliminierung von Packungsdefekten an der Grenzfläche zwischen den konstituierenden Monomeren, die Hydratation hydrophober Oberflächen und die Trennung von intermolekularen Ionenpaaren unter Druck begünstigt werden [Silva 1993], [Gross 1994], [Balny 1997], [Balny 2002], [Hummer 1998]. Alle diese Effekte tragen zu einem negativen Dissoziationsvolumen bei und führen somit, bereits bei moderaten Drücken bis ca. 2 kbar, zur Zerstörung der Quartärstruktur oligomerer Proteinassoziate [Gross 1994]. Im Falle des druckabhängigen Verhaltens von Insulin wurde anhand von Fourier-Transform Infrarot- (FT-IR)-Untersuchungen eine erstaunlich hohe Druckstabilität des Insulinmonomers auf der Ebene der Sekundärstruktur bei pH 2 bei Raumtemperatur nachgewiesen [Dirix 2003a]. Demzufolge können im Rahmen der vorliegenden Untersuchung, mit der Dissoziation einhergehende, signifikante konformelle Änderungen innerhalb des Monomers bei 20 °C ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu ergab eine Analyse der CD-Spektren im fernen UV, dass bei 60 °C die teilweise Entfaltung von Insulinmonomeren begünstigt wird, wobei deren Anteil in Anwesenheit von EtOH zunimmt [vgl. Kapitel 5.1.2.3]. Unter solchen Bedingungen ist es wahrscheinlich, dass Hochdruck die Bildung solcher teilweise entfalteten Konformationen zusätzlich fördert.

5.2.2 Einfluss von Druck auf die Aggregationskinetik von Insulin

5.2.2.1 Entwicklung eines neuen mechanistischen Szenarios aus der druck- und lösungsmittelabhängigen Aggregationskinetik des Proteins

Der Einfluss von Druck auf die Aggregationskinetik von Insulin bei 60 °C in verschiedenen Lösungsmittelsystemen wurde unter Verwendung des ThT-Assays untersucht. In Abbildung 5.12 (a) ist die zeitliche Entwicklung der normierten ThT-Fluoreszenz für 0,5 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und verschiedenen EtOH-Konzentrationen dargestellt. Darüber hinaus zeigt Abbildung 5.12 (b) die empirischen Parameter zur Beschreibung der Aggregationskinetik (r_{\max} und lag-Zeit), die aus einer Analyse der zeitabhängigen ThT-Fluoreszenz gemäß Gleichung (4.4) gewonnen wurden.

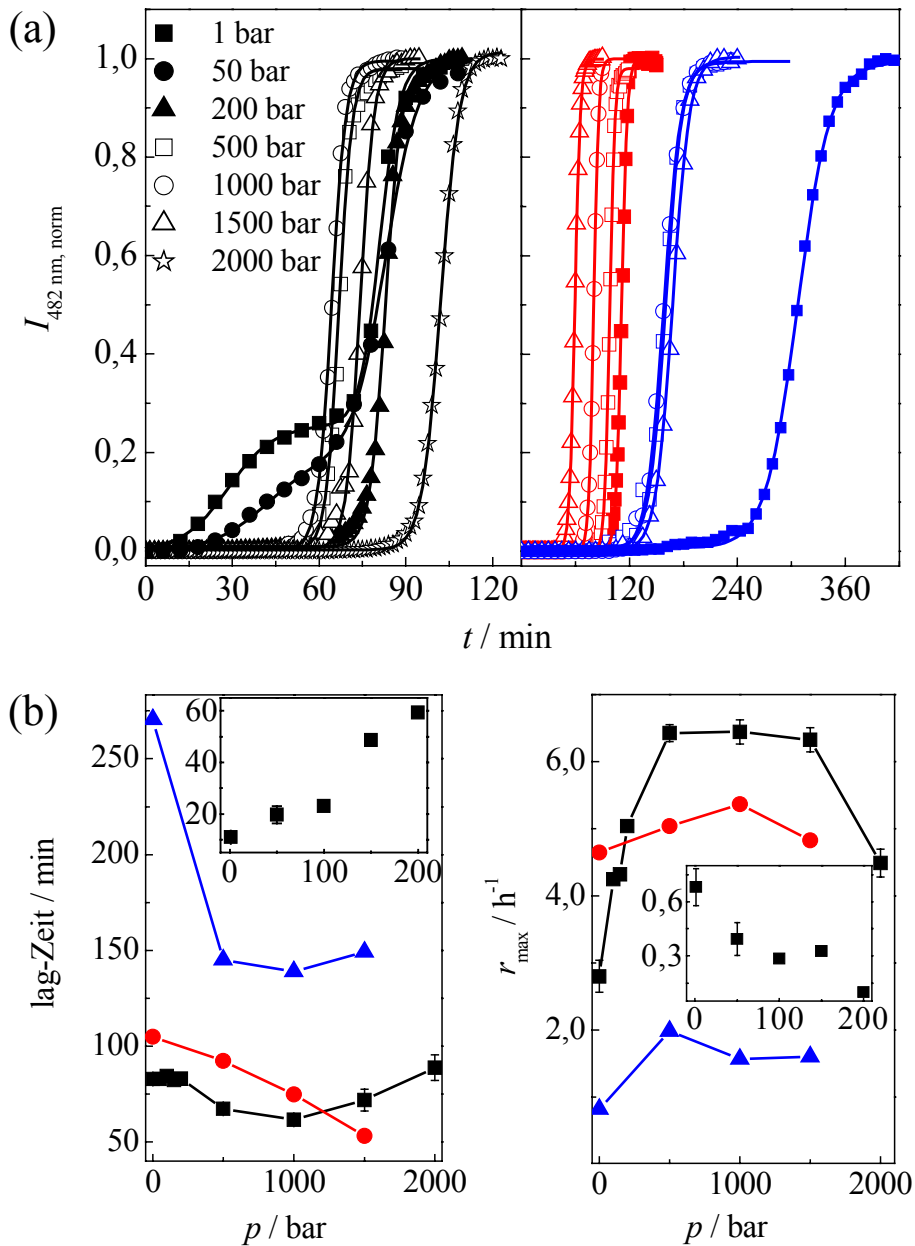


Abbildung 5.12: (a) Zeitliche Entwicklung der normierten ThT-Fluoreszenz für die Aggregation von 0,5 Gew.% Insulin unter Druck bei 60 °C in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 in Cosolvens-freier Lösung (schwarze Symbole), 5 Gew.% EtOH (rote Symbole) und 20 Gew.% EtOH (blaue Symbole). Die durchgängigen Linien repräsentieren die Ergebnisse einer Anpassung nach Gleichung (4.4). (b) Aus den Anpassungen erhaltene lag-Zeiten (links) und scheinbare maximale Wachstumsraten (rechts) für den Haupt-Aggregationsübergang. Die Insets zeigen die entsprechenden Werte für den Vorübergang in rein wässriger Lösung im Druckbereich bis 200 bar. Die Fehlerbalken stellen statistische Fehler aus mindestens 2 unabhängigen Messungen dar.

Die zeitabhängige Zunahme der ThT-Emission in Gegenwart von EtOH sowie die in rein wässriger Lösung bei Drücken oberhalb von etwa 200 bar zeigen erwartungsgemäß einen, für einen nukleationsabhängigen Aggregationsmechanismus typischen, sigmoiden Verlauf, der schon in Kapitel 5.1.2.2 diskutiert wurde. Bei Zusatz von 5 Gew.% EtOH ist mit steigendem Druck eine annähernd lineare Abnahme der lag-Zeiten zu beobachten, während die scheinbaren maximalen Wachstumsraten kaum, wenn überhaupt, zunehmen. Da offenbar unter diesen Bedingungen mit steigendem Druck eine Aggregationsbeschleunigung einher geht, sollten die entsprechenden scheinbaren Aktivierungsvolumina, ΔV^\ddagger , für die Keimbildung und das Aggregatwachstum negativ sein. In 20 Gew.% EtOH sind die lag-Zeiten signifikant länger und die scheinbaren maximalen Wachstumsraten bei allen Drücken deutlich kleiner als in 5 Gew.% EtOH, was wiederum den aggregationsinhibierenden Einfluss höherer EtOH-Konzentrationen belegt. Eine Aggregationsbeschleunigung ist in diesem Fall bei Druckzunahme bis etwa 500 bar zu beobachten. Bei höheren Drücken verhalten sich dagegen die lag-Zeit und die scheinbare maximale Wachstumsrate weitgehend druckunabhängig. In diesem Druckregime sind die normierten zeitlichen ThT-Intensitätsverläufe nahezu identisch, woraus gefolgert werden kann, dass die scheinbaren Aktivierungsvolumina für Keimbildung und Aggregatwachstum nur sehr klein sind.

Überraschender Weise lassen sich die ThT-Profile in rein wässrigen Lösungen bei kleinen Drücken unterhalb 200 bar empirisch nicht durch ein einfach-sigmoidales Modell beschreiben. Stattdessen weist die Fluoreszenzintensität in diesen Fällen eine doppelt-sigmoidale Zunahme auf (ein bemerkenswert analoges Verhalten wird auch für die zeitliche Zunahme der Anisotropie von Alexa 488 markiertem Insulin bei 60 °C (siehe Abbildung 7.4 im Anhang) beobachtet). Diese scheinbare Diskrepanz zu den Ergebnissen des ThT-Assays im Rahmen der Untersuchungen bei 1 bar (Kapitel 5.1) ist auf die konstruktionsbedingte, fehlende mechanische Durchmischung der Proben im Hochdruckautoklaven zurückzuführen. Der Einfluss von mechanischer Durchmischung auf die Aggregationskinetik von Insulin wird in Kapitel 5.2.2.2 daher noch ausführlicher diskutiert.

Im weiteren Verlauf der Diskussion wird formal der erste Anstieg einem Vor- und der zweite Anstieg einem Hauptübergang zugeordnet. Der Vorübergang vollzieht sich bei

Atmosphärendruck, wo er nur eine sehr kurze lag-Phase aufweist, am schnellsten und macht dabei ungefähr 30% des gesamten beobachteten Anstiegs der Fluoreszenzintensität aus. Mit steigendem Druck werden die lag-Zeiten länger sowie die scheinbaren maximalen Wachstumsraten geringer, und oberhalb von ca. 200 bar ist der Vorübergang auf der Basis des ThT-Assays spektroskopisch nicht mehr nachweisbar. Die beobachtete drastische Druckabhängigkeit impliziert ein sehr großes, positives Aktivierungsvolumen, $\Delta V_{\text{pre}}^{\ddagger} \gg 0$, für die Aggregationsprozesse, die während des Vorüberganges stattfinden. Im Druckbereich zwischen 200 bar und 1000 bar ist das Aggregationsverhalten von Insulin in rein wässriger Lösung qualitativ ähnlich zu dem in Gegenwart von EtOH. Die scheinbaren Aktivierungsvolumina für die Keimbildung und das Wachstum der Insulinaggregate sind offenbar negativ, da beide Prozesse leicht beschleunigt werden. Bei höheren Drücken ist jedoch eine Umkehrung dieser Trends festzuhalten, da die lag-Zeiten ansteigen und die scheinbaren maximalen Wachstumsraten oberhalb von 1000 bar wieder deutlich abnehmen. Diese Beobachtung stimmt mit Berichten über einen inhibitorischen Effekt von Druck auf die Aggregation von Insulin, allerdings in Abwesenheit von NaCl, überein [Jansen 2004], [Dirix 2003b].

Mechanistisches Modell zur Interpretation der lösungsmittelabhängigen Aggregationskinetik von Insulin unter Druck

Im Folgenden wird ein mechanistisches Modell zur Interpretation der lösungsmittelabhängigen Aggregationskinetik von Insulin unter Druck vorgeschlagen, dass den oben gemachten Beobachtungen Rechnung tragen soll. Es ist weitgehend gesichert, dass zu Beginn der Amyloidogenese von Insulin vermutlich teilweise entfaltete, aggregationsfähige Insulinmonomere zu oligomeren Aggregationskeimen assoziieren und anschließend zu reifen Fibrillen heranwachsen [Nielsen 2001a], [Ahmad 2003], [Ahmad 2004]. Die Bildung oligomerer Aggregationskeime sollte in der Regel einen reversiblen, langsamen und schließlich geschwindigkeitsbestimmenden Prozess auf dem Fibrillbildungspfad darstellen. Allerdings scheint unter besonderen Umständen, nämlich bei geringen Drücken und in Abwesenheit von destabilisierenden Cosolventien, wie z. B. EtOH, als auch unter diffusionskontrollierten Bedingungen, teilweise entfalteten Insulinmolekülen ein alternativer, wesentlich schnellerer Aggregationspfad offen zu stehen. Ein solcher, der sich im Auftreten eines

Vorüberganges im ThT-Emissionsprofil äußert, scheint über einen Übergangszustand zu verlaufen, der ein größeres Volumen als der für die Assoziation von Monomeren zu Aggregationskeimen aufweist. Die Volumenzunahme im Zuge der Oligomerisierung resultiert wahrscheinlich hauptsächlich aus unkompensierten Packungsdefekten an der Monomer-Monomer-Grenzfläche. Die Aggregate, die sich auf diese Weise bilden, könnten einerseits alternative Vorläufer für Fibrillbildungskeime oder andererseits das Produkt einer Parallelreaktion darstellen, die abseits des Fibrillbildungspfades stattfindet. Im letzteren Fall würde der alternative Aggregationsprozess dennoch nicht in einer „Sackgasse“ abseits des Fibrillbildungspfades enden, wenn davon ausgegangen wird, dass die in der Parallelreaktion gebildeten Assoziate (im Folgenden als ThT-positive, „off-pathway“-Aggregate bezeichnet) reversibel, im Gleichgewicht mit teilweise entfalteten Insulinmonomeren, gebildet werden. Diese wiederum können in einer langsamen, reversiblen Reaktion oligomere Fibrillbildungskeime bilden, die, letztendlich irreversibel, zu Amyloidfibrillen heranwachsen und den Hauptübergang im ThT-Emissionsprofil hervorrufen. In diesem Zusammenhang könnten die vermuteten „off-pathway“-Aggregate ein alternatives, reversibles Reservoir für Insulinmoleküle, die später auf dem Fibrillbildungspfad aggregieren, darstellen. Tatsächlich haben AFM-Untersuchungen gezeigt, dass diese Aggregate, im Gegensatz zu denen nach vollständiger Aggregation bei 60 °C, keinerlei fibrillären morphologischen Charakteristika aufweisen, sondern amorph sind [Grudzielanek 2006]. Deren Fähigkeit, trotzdem eine ThT-positive Fluoreszenz aufzuweisen, korrespondiert vermutlich mit der Affinität intermolekularer β -Faltblattstrukturen, die IR-spektroskopisch nachgewiesen worden konnten, für den Fluorophor [Grudzielanek 2006].

Das bisher vorgeschlagene mechanistische Szenario ist insofern plausibel, als auch für LEN, eine variable Domäne der leichten Ketten von κ IV Immunglobulin, die Existenz einer zur Fibrillbildung konkurrierenden Parallelreaktion nachgewiesen werden konnte, in der sich alternative Aggregate bilden [Souillac 2002a], [Souillac 2002b], [Souillac 2003]. Auch hierbei wurden zweiphasige zeitliche Änderungen von aggregationspezifischen Parametern, wie z.B. der ThT-Fluoreszenz, beobachtet.

Unter Druck wird der alternative Aggregationspfad aufgrund des hohen positiven Aktivierungsvolumens zunehmend inhibiert, und die direkte Bildung von Fibrillbildungskeimen wird stattdessen begünstigt, da sie, wie auch das

Fibrillwachstum, über einen Übergangszustand mit einem negativen Aktivierungsvolumen verläuft. Ein negatives Aktivierungsvolumen impliziert seinerseits, dass die Übergangszustände für die Keimbildung und das anschließende Fibrillwachstum wahrscheinlich geringer hydratisiert und / oder dichter gepackt sind als die teilweise entfalteten Insulinmonomere. Letztlich äußert sich dieser Umstand in einer leichten Beschleunigung der Fibrillbildung in rein wässriger Lösung bei Drücken bis zu etwa 1000 bar. Bei höheren Drücken bestimmt jedoch offensichtlich ein Prozess, mit dem ein positives Aktivierungsvolumen verbunden ist, die Kinetik der Fibrillbildung, denn unter solchen Druckbedingungen wird die Fibrillbildung verlangsamt. In einer kürzlich erschienenen PPC- (pressure perturbation calorimetry)-Studie zur Aggregation von Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 2 konnte gezeigt werden, dass die thermisch induzierte Bildung monomerer Faltungsintermediate mit einer Volumenzunahme aufgrund der Exposition von, ursprünglich im Proteininneren verborgenen, hydrophoben Seitenketten und der Freisetzung von Wassermolekülen einhergeht [Dzwolak 2005]. In ähnlicher Weise könnte eine Volumenzunahme aufgrund der teilweisen Entfaltung von Insulinmonomeren die negative Volumenänderung im Zuge des anschließenden Fibrillbildungsprozesses überkompensieren, so dass netto eine Aggregationsverlangsamung oberhalb von 1000 bar beobachtet wird.

In Gegenwart von EtOH stellt sich das mechanistische Szenario zur Beschreibung der Aggregationskinetik von Insulin unter Druck leicht modifiziert dar. Zwar wird, wie in Kapitel 5.1 dargelegt, der Anteil aggregationskompetenter Monomere in EtOH erhöht, doch deutet das Ausbleiben eines Vorübergangs im ThT-Emissionsprofil an, dass selbst in 5 Gew.% EtOH keine signifikanten Konzentrationen ThT-positiver „off pathway“-Aggregate gebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigenden Alkoholkonzentrationen EtOH-enthaltende wässrige Lösungen in Hinsicht auf die Fibrillbildung zunehmend einen chaotropen Charakter aufweisen und diese vor allem aufgrund der Abschwächung hydrophober Wechselwirkungen inhibieren. Analog impliziert das Ausbleiben des Vorüberganges im ThT-Emissionsprofil in EtOH einen dominanten Beitrag von hydrophoben Wechselwirkungen zur Stabilität der „off pathway“-Aggregate. Davon abgesehen, beschleunigt moderater Druck in Gegenwart von EtOH die Fibrillbildung, vermutlich in ähnlicher Weise wie in rein wässriger Lösung zwischen 200 bar und 1000 bar, d.h., aufgrund kompakter und / oder nur

geringfügig hydratisierter Übergangszustände für Keimbildung und Fibrillwachstum. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass in der Literatur auch ein desolvatisierender Effekt von Alkoholen auf Proteine diskutiert wird [Bull 1978], [Fioroni 2002]. Ein solcher könnte sich in einer Abnahme des Betrages des negativen Aktivierungsvolumens für Keimbildung und Fibrillwachstum bei Zusatz von 20 Gew.% EtOH äußern und somit die relativ druckunabhängige Aggregationskinetik von Insulin bei Drücken oberhalb von ca. 500 bar erklären.

5.2.2.2 Charakterisierung von „off pathway“ Aggregaten in rein wässriger Lösung

Der ThT-Assay für Insulin in rein wässriger, 0,1 M NaCl enthaltender Lösung bei geringen Drücken offenbart einen neuartigen, bisher unbekanntem, zur Fibrillbildung alternativen Aggregationspfad. Zur näheren Charakterisierung der Faktoren, die diesen Aggregationspfad begünstigen und zur Stabilisierung der resultierenden „off pathway“-Aggregate beitragen, wurde der ThT-Assay in Cosolvens-freier Lösung auch in Abwesenheit von NaCl sowie unter mechanischer Durchmischung der Proben durchgeführt. Im Allgemeinen erhöht die Abwesenheit von Salz repulsive elektrostatische Wechselwirkungen zwischen hochgradig positiv geladenen Insulinmolekülen, während eine mechanische Durchmischung der Proben Diffusionskontrolle als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Aggregation ausschließt. Die entsprechenden zeitlichen ThT-Emissionsprofile sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass sich sowohl in Abwesenheit von NaCl als auch bei mechanischer Durchmischung das komplexe zeitliche ThT-Emissionsprofil auf ein einfach-sigmoiden Profil reduziert. Allerdings beschleunigt eine mechanische Durchmischung den Aggregationsprozess, während die Abwesenheit von Salz zu einer signifikanten Aggregationsverlangsamung führt.

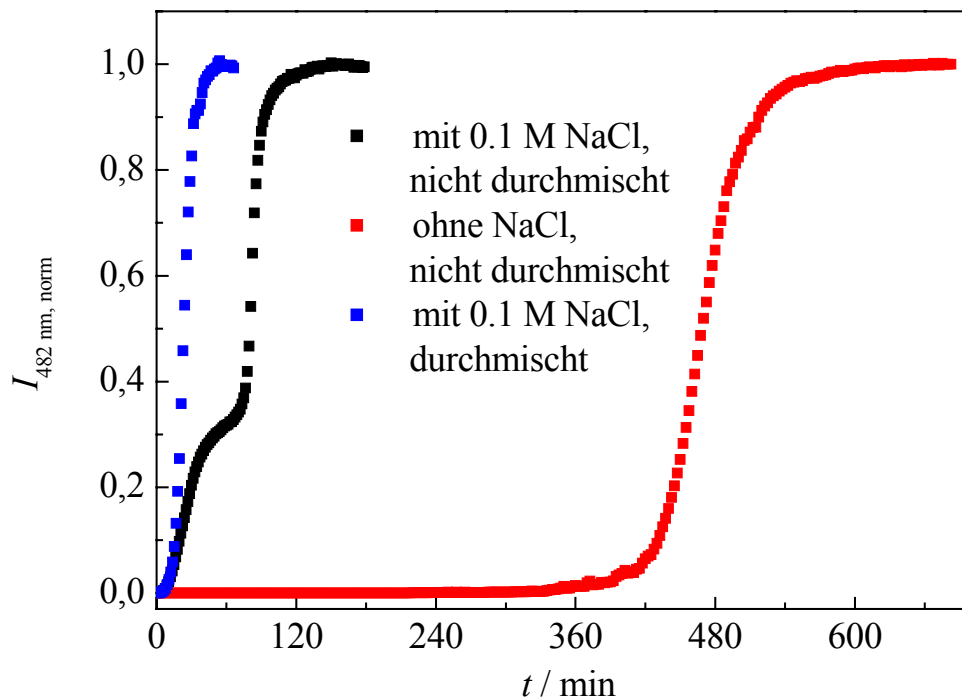


Abbildung 5.13: Einfluss von NaCl und mechanischer Durchmischung auf die zeitliche Entwicklung der normierten ThT-Fluoreszenz für die Aggregation von 0,5 Gew.% Insulin bei 1 bar in wässriger Lösung bei pH 1,9 und 60 °C.

Der beobachtete Einfluss von mechanischer Durchmischung lässt sich unter der Annahme eines diffusionskontrollierten Aggregationsprozesses verstehen. Die Wachstums-geschwindigkeit, sowohl der „off pathway“ Aggregate als auch der Fibrillbildungskeime wird durch die Diffusion freier Insulinmonomere zu den wachsenden Aggregaten limitiert. Im Falle einer mechanischen Durchmischung entfällt das Diffusionslimit, und vorhandene Aggregationskeime können sofort auf Kosten der Bildung von „off pathway“-Aggregaten zu reifen Amyloidfibrillen auswachsen. Daneben könnte die Bildung von Fibrillkeimen, die hochgradig von der Proteinkonzentration abhängt, auch von der erhöhte Konzentration teilweise entfalteter Insulinmonomere profitieren, die an der hydrophoben Wasser / Rührfisch-Grenzfläche begünstigt werden [Sluzky 1991]. Abgesehen vom Einfluss von Diffusionskontrolle, sind die „off pathway“-Aggregate nur hinreichend stabil, wenn die repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen hochgradig positiv geladenen

Insulinmolekülen durch den Zusatz von Salz abgeschirmt werden. Findet hingegen eine solche Ladungsabschirmung nicht statt, verschiebt sich das vermutete Gleichgewicht zwischen teilweise entfalteten Insulinmolekülen und ThT-positiven „off pathway“-Oligomeren auf die Seite der monomeren Spezies. In einem solchen Fall wird daher kein Vorübergang im ThT-Emissionsprofil beobachtet.

5.2.3 Druckstabilität verschiedener Aggregatformen von Insulin

5.2.3.1 Qualitative Untersuchung des Druckverhaltens aggregierter Insulinspezies

Die Beobachtung, dass, neben anderen Faktoren, Druck die Bildung von „off pathway“-Aggregaten inhibiert, wirft die Frage auf, ob solche Aggregate auch *nach* ihrer Bildung durch Druck reversibel dissoziiert werden können. Zur Beantwortung dieser Frage wurde Insulin bei 1 bar in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 60 °C inkubiert und der Verlauf der ThT-Emission im Anschluss an positive Drucksprünge von 1 kbar zu verschiedenen Zeitpunkten der Aggregation spektroskopisch verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.14 dargestellt. Im Anschluss an einen positiven Drucksprung nach 35-minütiger Inkubation bei 60 °C, d. h., nach Erreichen eines Plateaus für die Fluoreszenzintensität im Rahmen des Vorüberganges, fällt die Emissionsintensität – nach einem schnellen, transienten „Überschießen“ - steil ab, doch die Probe beginnt daraufhin schnell zu re-aggregieren (Abbildung 5.14(a)). Die schnelle Re-Aggregation bei 1 kbar stimmt gut mit dem aggregationsbeschleunigendem Effekt von Drücken in dieser Größenordnung überein, der in Kapitel 5.2.2.1 diskutiert wurde. Im Gegensatz dazu steigt die ThT-Emission im Anschluss an einen positiven Drucksprung nach vollständiger Aggregation an. In beiden Fällen führt eine Druckrelaxation auf 1 bar nach vollständiger Aggregation zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals. Das scheinbar gegensätzliche Verhalten der Fluoreszenzintensität infolge eines positiven Drucksprunges kann unter Berücksichtigung des entsprechenden Signals der statischen Lichtstreuung bei $\lambda = 350$ nm für ThT-freie Proteinproben erklärt werden. In der Regel sollte eine Änderung der Aggregatgröße auch zu einer Änderung der statischen Lichtstreuung führen, wobei mit einer Abnahme der Teilchengröße eine Abnahme der Lichtstreuungsintensität verbunden ist.

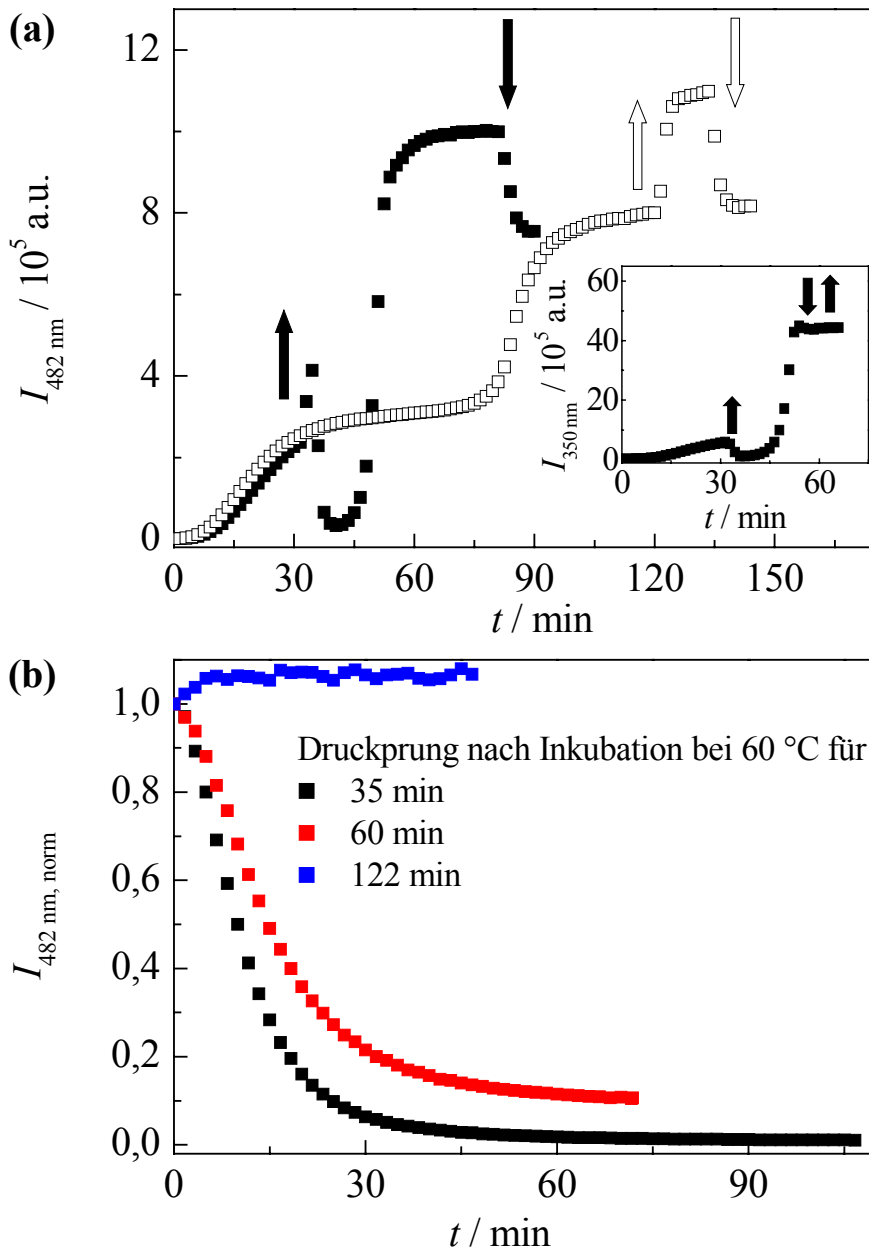


Abbildung 5.14: (a) Zeitliche Entwicklung der ThT-Emission für 0,5 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 60 °C im Anschluss an Drucksprünge von 1 kbar in der Anfangsphase der Aggregation bzw. nach kompletter Aggregation. Die Richtung der Pfeile entspricht einer Druckerhöhung bzw. einer Relaxation. Inset: Entwicklung der entsprechenden Intensität der statischen Lichtstreuung bei $\lambda = 350 \text{ nm}$. (b) Zeitliche Abnahme der normierten ThT-Emission bei 20 °C im Anschluss an einen positiven Drucksprung von 1 kbar nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 60 °C. Vor den Drucksprüngen wurden die Proben auf 20 °C abgekühlt.

Im Anschluss an einen positiven Drucksprung nach 35 min fällt die Lichtstreuungsintensität zunächst signifikant ab, bleibt aber im Anschluss an bidirektionale Drucksprünge nach vollständiger Aggregation jeweils konstant. Diese Beobachtung impliziert folgende Schlussfolgerungen: Einerseits wird der Anstieg der ThT-Emission im Anschluss an einen positiven Drucksprung nach vollständiger Aggregation lediglich durch einen „elastischen“ Druckeffekt auf die Fluoreszenzintensität verursacht. Andererseits korrespondiert lediglich die Abnahme der ThT-Emission nach einem positiven Drucksprung zu einem frühen Aggregationszeitpunkt mit der Dissoziation ThT-positiver, „off pathway“-Aggregate. Folglich können bereits gebildete Insulinaggregate unter Druck nur dann dissoziiert werden, wenn sie nicht vollständig ausgebildet, d.h., in fibrillärer Form vorliegen. Darüber hinaus unterstützt die Beobachtung, dass bei 60 °C im Anschluss an einen positiven Drucksprung eine beschleunigte Aggregation erst nach einer vorübergehenden Dissoziation früher Aggregaten stattfindet, die Hypothese, dass diese Aggregate keine direkten Vorläufer für Fibrillen darstellen, sondern in einer Parallelreaktion gebildet werden. Schließlich deutet die umgehende Re-Aggregation druckinduzierter „off pathway“-Aggregate auf eine aggregationsanfälligeren Konformation der konstituierenden Monomere als die Konformation zu Beginn der Aggregation bei hohen Temperaturen hin.

Durch ein rasches Abkühlen der Proben auf 20 °C vor der Ausübung von Drucksprüngen lassen sich die bis dahin gebildeten Aggregate weitgehend ohne die Komplikation einer Re-Aggregation hinsichtlich ihres Druckverhaltens untersuchen. Die entsprechenden Ergebnisse des ThT-Assays sind für verschiedene Inkubationszeiten des Proteins bei 60 °C in Abbildung 5.14(b) dargestellt. Die normierte ThT-Emissionsintensität fällt nach 35-minütiger Inkubation im Anschluss an einen positiven Drucksprung auf weniger als 1% der anfänglichen Intensität ab, ohne Anzeichen für eine Re-Aggregation aufzuweisen. Zu späteren Zeitpunkten (z. B. nach 60-minütiger Inkubation bei 60 °C) nimmt die ThT-Emissionsintensität im Anschluss an einen Drucksprung nur unvollständig ab, bis schließlich die Proteinspezies nach vollständiger Aggregation (z. B. nach 122-minütiger Inkubation) bei mittleren Drücken von 1 kbar druckunempfindlich sind. Demzufolge bilden sich nur die Aggregate in der

frühen Aggregationsphase, d. h., die ThT-positiven „off pathway“-Aggregate, hinsichtlich ihres Druckverhaltens vollständig reversibel.

Ergänzende qualitative Informationen über das Druckverhalten von „off pathway“-Aggregaten wurden aus einer Analyse der Anisotropie von Alexa 488-markiertem Insulin erhalten. In Abbildung 5.15 ist die zeitliche Entwicklung des scheinbaren hydrodynamischen Volumens von 0,5 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 20 °C im Anschluss an einen positiven Drucksprung von 1 kbar nach 35-minütiger Inkubation bei 60 °C dargestellt.

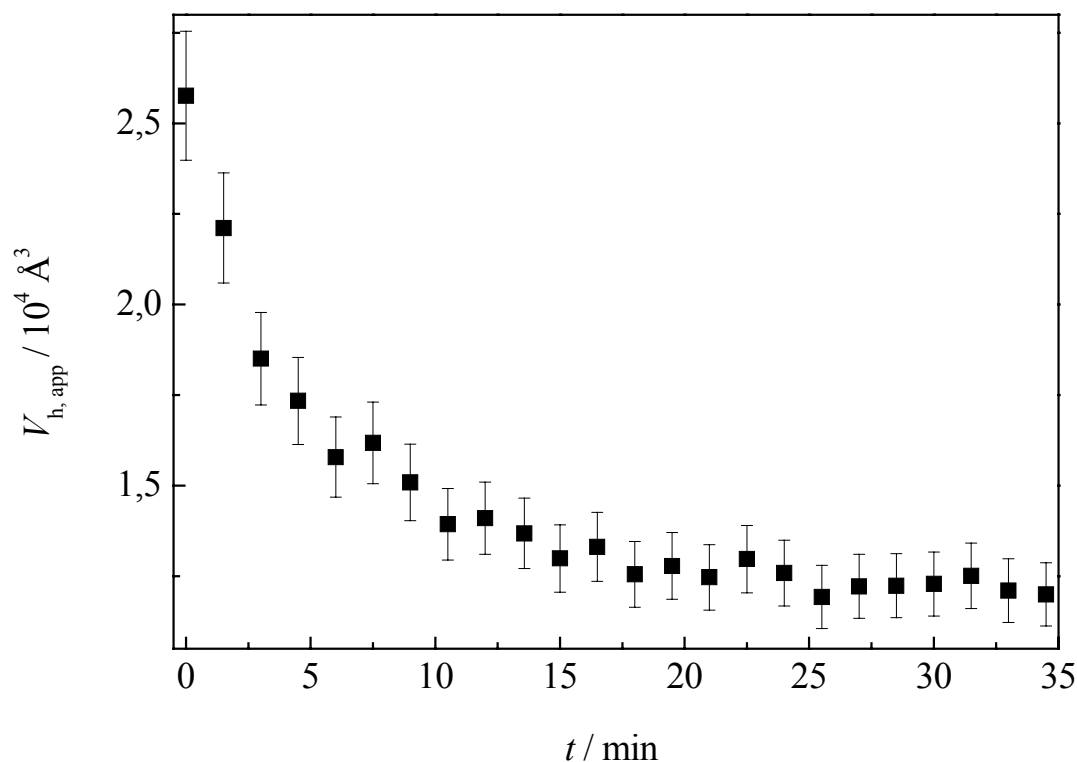


Abbildung 5.15: Zeitliche Entwicklung des scheinbaren hydrodynamischen Volumens von 0,5 Gew.% Alexa 488-markiertem Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 bei 20 °C im Anschluss an einen positiven Drucksprung von 1 kbar nach 35-minütiger Inkubation bei 60 °C. Die Werte für das scheinbare hydrodynamische Volumen des Proteins wurden nach Gleichung (4.10) unter Berücksichtigung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer (siehe Abbildung 7.5 im Anhang) berechnet. Die Fehlerbalken stellen statistische Fehler aus zwei unabhängigen Messungen dar.

Die beobachtete Abnahme des scheinbaren hydrodynamischen Volumens belegt die, aus dem ThT-Assay und der statischen Lichtstreuung gefolgerte, druckinduzierte Dissoziation von „off pathway“-Aggregaten. Bemerkenswerter Weise stimmt im Rahmen des Fehlers der ermittelte Wert für das scheinbare hydrodynamische Volumen des Proteins, $V_{h, \text{app}} = (12000 \pm 600) \text{ \AA}^3$, nach 35 min bei 1 kbar mit dem Wert im prä-aggregierten Zustand ($V_{h, \text{app}} = (12100 \pm 900) \text{ \AA}^3$) überein (siehe Abbildung 5.11). Demzufolge wird unter Druck das Gleichgewicht zwischen ThT-positiven „off pathway“-Aggregaten und dissoziierten Spezies auf die Seite von Insulinmonomeren verschoben

Es bleibt festzuhalten, dass die ausgeprägte Druckempfindlichkeit der ThT-positiven „off pathway“-Aggregate ein deutlich negatives Dissoziationsvolumen impliziert. Dieses ist vermutlich auf die vorherrschenden Beiträge von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zur Aggregatstabilität zurückzuführen, da im Allgemeinen die Aufhebung solcher Wechselwirkungen mit negativen Reaktionsvolumina einher geht [Gross 1994]. Darüber hinaus zeichnen sich die aggregierten Spezies wahrscheinlich durch nicht-optimierte Packungsmoden der Proteinseitenketten und daraus resultierenden Packungsdefekten aus, die ebenfalls hochgradig drucksensitiv sind. Obwohl FT-IR-Untersuchungen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, die annähernd druckunempfindlich sind, in den Aggregaten nachgewiesen haben, scheint die Stabilisierung der Aggregate durch annähernd druckunempfindliche Wasserstoffbrücken nur eine untergeordnete Rolle zu spielen [Grudzielanek 2006]. Im Gegensatz dazu sollten sich die reifen Insulinfibrillen nach vollständiger Aggregation durch ein ausgeprägtes Netzwerk intermolekularer Wasserstoffbrücken und eine optimierte Packung der Seitenketten auszeichnen, was deren Druckunempfindlichkeit Rechnung tragen würde. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden auch von Dirix *et al.* gezogen, die eine zeitlich zunehmende Druckunempfindlichkeit für ein Fragment von Transthyretin unter Bedingungen beobachtet haben, die eine Fibrillbildung hervorrufen [Dirix 2005].

Da sowohl der ThT-Assay als auch die Anisotopieuntersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruktionsbedingt im Hochdruckautoklaven nur in einem begrenzten Druckbereich durchgeführt werden konnten, konnte der Einfluss sehr hoher

Drücke auf reife Insulinfibrillen mit diesen Untersuchungsmethoden nicht ermittelt werden. An anderer Stelle wurde aus druckabhängigen FT-IR-Untersuchungen auf eine reversible laterale Dissoziation von Protofilamenten in reifen Insulinfibrillen bei 10 kbar geschlossen, wobei diese Untersuchungen in Abwesenheit von Salz durchgeführt wurden [Dirix 2002]. Allerdings wird auch eine mögliche druckinduzierte Hydratation der aggregierten Polypeptidrückgrate zur teilweisen Erklärung der beobachteten Änderungen in den FT-IR-Spektren des Proteins bei sehr hohen Drücken diskutiert [Dzwolak 2004a].

5.2.3.2 Quantitative Untersuchung der Dissoziationskinetik von „off-pathway“-Aggregaten unter Druck

Die Möglichkeit, intermediäre Aggregatformen von Insulin zu isolieren und hinsichtlich ihres Druckverhaltens zu charakterisieren, geht über ein rein wissenschaftliches Interesse hinaus. Um auch erste Aussagen über technologische Anwendungsmöglichkeiten der Hochdruckbehandlung von Insulinaggregaten treffen zu können, wurde die Druck- und Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskinetik von abgekühlten „off pathway“-Insulinaggregaten detaillierter untersucht. In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse des ThT-Assays für die Dissoziation dieser Aggregate nach 35-minütiger Inkubation bei 60 °C im Druckbereich zwischen 1 bar und 2 kbar bei niedrigen Temperaturen (10-30 °C) dargestellt. Die normierten ThT-Emissionsverläufe wurden anschließend zur Ermittlung der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten, k_{diss} , für die Dissoziation der Aggregate an ein monoexponentielles Modell nach Gleichung (4.5) angepasst. Dieses Modell basiert auf der, sicherlich vereinfachenden, Annahme, dass die Geschwindigkeitskonstante für die Abnahme der ThT-Fluoreszenz proportional zur Masse an ThT-positivem Aggregat ist, und dass eine Aggregatpopulation mit homogener Größe und Drucksensitivität in Lösung vorliegt. Jedoch liefert eine Datenanalyse auf Basis eines ein wenig vereinfachenden, biexponentiellen Modells keine signifikante Verbesserung der Anpassungen. Da weder die genaue Größenverteilung der Aggregate noch deren Drucksensitivität bekannt ist, ist das einfache, empirische monoexponentielle Modell alternativen, höherexponentiellen Modellen wahrscheinlich vorzuziehen.

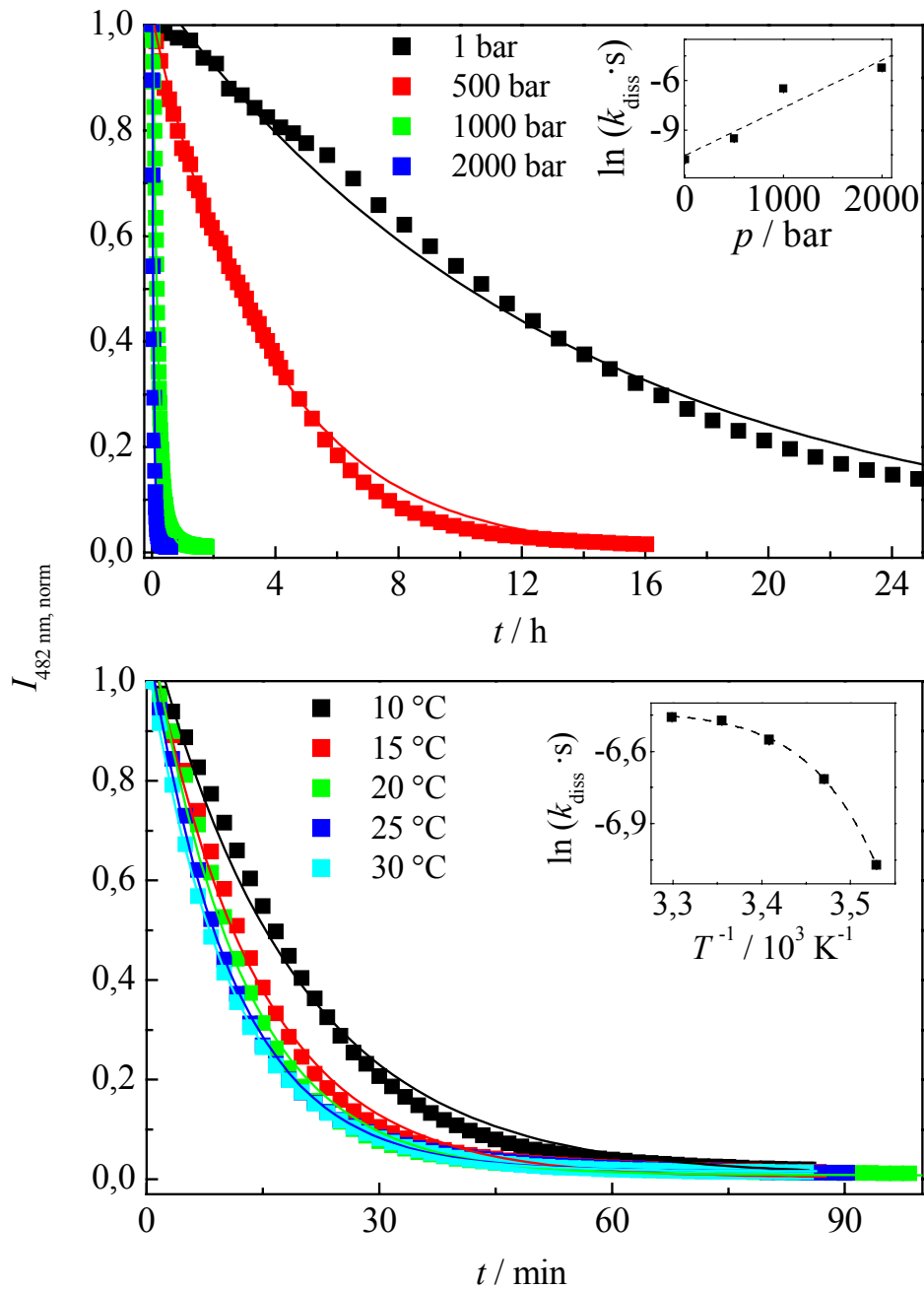


Abbildung 5.16: Zeitliche Abnahme der normierten ThT-Emission für 0,5 Gew.% aggregiertes Insulin in 0,1 M NaCl, pH 1,9 als Funktion des Druckes bei 20 °C (oben) und als Funktion der Temperatur bei 1 kbar (unten). Jede Proteinprobe wurde vor der Messung nach 35-minütiger Aggregation bei 60 °C rasch abgekühlt. Die durchgängigen Linien sind das Ergebnis einer monoexponentiellen Anpassung der Daten gemäß Gleichung (4.5). Die Eyring- und Arrhenius-Auftragungen der jeweiligen scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation der Aggregate sind jeweils als Insets dargestellt.

Der obere Teil von Abbildung 5.16 zeigt, dass mit zunehmendem Druck die Dissoziationskinetik der Aggregate bei 20 °C drastisch beschleunigt wird. Während die Hälfte des anfänglich vorhandenen Aggregates innerhalb von etwa 11 h bei Atmosphärendruck dissoziiert, geschieht dies bei einem Druck von 2 kbar in nur knapp 3 min. Eine Eyring-Auftragung der jeweiligen scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation liefert ein deutlich negatives scheinbares Aktivierungsvolumen für die Dissoziation, $\Delta V_{\text{diss, app}}^{\ddagger} = (-70 \pm 16) \text{ ml} \cdot \text{mol}^{-1}$. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die bei 1 bar auf 20 °C abgekühlten Aggregate keine spektroskopisch sichtbaren Anzeichen für eine Re-Aggregation zeigen. Diese Beobachtung liefert ein weiteres Indiz dafür, dass die „off pathway“-Aggregate keine direkten, effektiven Aggregationskeime für die Fibrillbildung darstellen, die unter diesen Umgebungsbedingungen in der Regel eine schnelle Fibrillbildung initiieren [Dzwolak 2004b].

Die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskinetik von „off pathway“-Aggregaten wurde bei einem Druck von 1 kbar untersucht (unterer Teil in Abbildung 5.16). Die Disaggregationsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Temperatur im Bereich zwischen 10 °C und 30 °C. Zudem dissoziiert in allen Fällen das Aggregat zu > 99%, so dass im Umkehrschluss die Bildung der Aggregate quasi-reversibel erfolgt. Anders als bei der linearen Eyring-Auftragung, wird allerdings ein nicht-linearer Verlauf der Arrhenius-Auftragung beobachtet, und die scheinbare Aktivierungsenergie, $E_{\text{a, app}}$, nimmt von ca. 78 kJ·mol⁻¹ bei 10 °C auf etwa 2 kJ·mol⁻¹ bei 30 °C ab. Der sehr geringe Wert für die scheinbare Aktivierungsenergie bei 30 °C entspricht nur ungefähr ein Fünftel der Wechselwirkungsenergie einer Wasserstoffbrückenbindung, was bedeutet, dass die Aggregate unter diesen Bedingungen kinetisch äußerst labil sind. Bereits bei 35 °C ist eine einfache kinetische Analyse des Dissoziationsverhaltens der Aggregate bei 1 kbar nicht mehr möglich, da unter solchen Bedingungen, ähnlich wie bei 60 °C (siehe Abbildung 5.14(a)), eine langsame Re-Aggregation der dissoziierten Proteinspezies einsetzt (nicht dargestellt). Bei höheren Temperaturen wird der disaggregierte Zustand des Proteins demnach thermodynamisch instabil und wandelt sich in einen thermodynamisch günstigeren, oligomeren Zustand um, aus dem letztendlich durch Wachstum Amyloidfibrillen resultieren. Aus technologischer Hinsicht deuten die kinetischen Daten darauf hin, dass die Dissoziation nicht-fibrillärer,

oligomerer Proteinspezies bei moderaten Drücken und Umgebungstemperatur durchaus technologisch möglich ist. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob die druckinduziert dissoziierten, wahrscheinlich monomeren, Proteinspezies, ihre vollständige biologische Aktivität entfalten, wie es für pharmazeutische Produkte, z. B. für Insulintherapeutika, wünschenswert wäre.

Zusammenfassend ist der Konsens aus dem mechanistischen Modell zur Interpretation der lösungsmittelabhängigen Aggregationskinetik von Insulin unter Druck und des Druckverhaltens verschiedener Insulinaggregate der Übersicht halber im Anhang in Abbildung 6.1 als vereinfachtes Schema dargestellt.

5.3 Einfluss von Modellbiomembranen auf das Aggregationsverhalten von Insulin

Von Insulin ist bekannt, dass es nach der Freisetzung aus der Bauchspeicheldrüse auf der extrazellulären Seite an transmembrane Insulinrezeptoren bindet und auf diese Weise die zelluläre Kette des Glukosemetabolismus in Gang setzt [Nystrom 1999], [Ottensmeyer 2000]. Demnach kann das Protein lokal an der Zellmembran akkumuliert werden. Von besonderem Interesse aus der Sicht der Amyloidforschung ist die Beobachtung, dass eine Akkumulation von Insulin bei der Behandlung von Diabetes infolge wiederholter Insulininjektionen zur Ausbildung einer lokal begrenzten, iatrogenen Insulin-abhängigen Amyloidose führen kann [Störkel 1983], [Dische 1988], [Swift 2002]. Allerdings ist der genaue Bildungsmechanismus der fibrillären Amyloidablagerungen an den Zellmembranen des betroffenen Gewebes noch weitgehend ungeklärt.

Die Frage, wie und ob lipidäre Membrankomponenten das Aggregationsverhalten von Insulin beeinflussen können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand von Untersuchungen der Wechselwirkungen von Insulin mit Modellbiomembranen unter aggregationsfördernden Bedingungen näher beleuchtet. Konkret wurde der Einfluss des Phasenüberganges von der Gelphase in die fluide Phase, der Kettenlänge gesättigter Lipide, des Ladungszustandes und des Einflusses von Krümmungsstress auf die Aggregationskinetik von Insulin in Gegenwart unilamellarer Lipidvesikel untersucht.

Die Ergebnisse des ThT-Assays erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit und sollten zudem für eine detaillierte Interpretation durch weitere biophysikalischen Untersuchungsmethoden ergänzt werden. Jedoch kann eine vorläufige phänomenologische Dokumentation von Membraneigenschaften, die die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins beschleunigen, verlangsamen oder keinen Effekt aufweisen, erste Hinweise auf relevante Wechselwirkungsmechanismen zwischen Protein und Lipidmembran geben.

5.3.1 Ergebnisse des ThT-Assays

Repräsentative zeitliche Verläufe der ThT-Emission für die Aggregation von Insulin in Gegenwart verschiedener ausgewählter Lipidsysteme bei pH 7,4 bei Zusatz von 0,1 M NaCl sind in Abbildung 7.6 im Anhang dargestellt. Die Zeiten für die halbmaximale Aggregation, $t_{0,5}$, als empirisches Maß für die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins in Gegenwart eines 10-fachen molaren Lipidüberschusses verschiedener Zusammensetzungen bei pH 1,9 und pH 7,4, sind in den Abbildungen 5.17-5.20 dargestellt.

Aggregationskinetik im Temperaturbereiches des Phasenüberganges von DSPC

Die Temperaturabhängigkeit der Aggregationskinetik von Insulin in Gegenwart von DSPC-Vesikeln wurde bei pH 1,9 und pH 7,4 bei Zusatz von 0,1 M NaCl im jeweiligen Temperaturbereich des Gel-Fluid-Phasenüberganges des Lipids untersucht (Abbildung 5.17). Aus DSC-Thermogrammen (siehe Abbildung 7.7 im Anhang) wurden die Hauptübergangstemperaturen, T_m , zu 66,8 °C (bei pH 1,9) bzw. 54,1 °C (bei pH 7,4) und die volle Halbwertsbreite des Phasenüberganges, $FWHH$, zu 7,1 °C (bei pH 1,9) bzw. 0,5 °C (bei pH 7,4) ermittelt. Die Zunahme vom T_m mit sinkendem pH-Wert ist für Phospholipide in der Literatur gut dokumentiert und wird, u.a., der Stabilisierung der Membran im Kopfgruppenbereich durch die Ausbildung transienter intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen protonierten Phosphatgruppen benachbarter Lipidmoleküle zugeschrieben [Koyonova 1998].

Erwartungsgemäß nimmt in Abwesenheit von Lipidvesikeln die Zeit für die halbmaximale Aggregation, $t_{0,5}$, bei beiden pH-Werten mit steigender Temperatur ab,

d. h., die Aggregation des Proteins wird mit zunehmender Temperatur beschleunigt. Darüber hinaus verläuft die Aggregation bei neutralem pH-Wert etwas langsamer als bei pH 1,9, was wahrscheinlich auf die Stabilisierung des Proteins im Zuge der bevorzugten Hexamer-Bildung bei pH 7,4 zurückzuführen ist, dessen Dissoziation als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Aggregation vorgeschlagen wurde [Ahmad 2003].

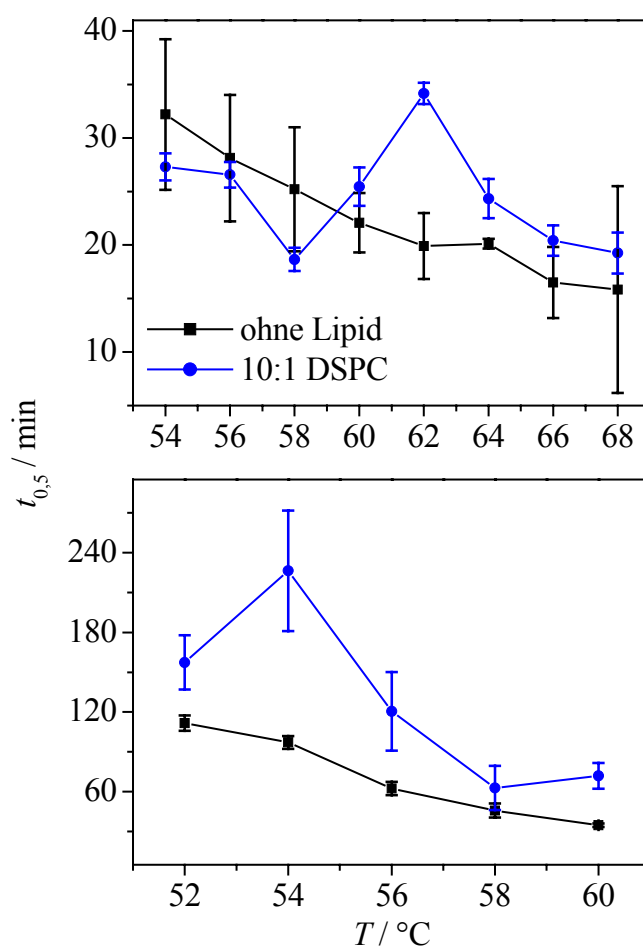


Abbildung 5.17: Einfluss der Temperatur im Bereich des Gel-Fluid-Phasenüberganges von DSPC auf die Aggregationskinetik von 0,05 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 (oben) und pH 7,4 (unten). Dargestellt sind die Zeiten für die halbmaximale Aggregation des Proteins bei 10-fachem molarem Lipidüberschuss, basierend auf der Auswertung des ThT-Assays. Proteinlösungen ohne Lipidvesikel, aber ansonsten gleichen Bedingungen, wurden zu Kontrollmessungen eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen jeweils statistische Fehler aus mindestens zwei unabhängigen Messungen dar.

Dem gegenüber weist die Temperaturabhängigkeit von $t_{0,5}$ in Gegenwart von DSPC-Vesikeln ein signifikantes Maximum bei ca. 62 °C (bei pH 1,9) bzw. 54 °C (bei pH 7,4) auf, d.h., im Bereich um die Hauptübergangstemperatur des Lipids erfolgt eine maximale Inhibierung der Proteinaggregation. Im Vergleich zur jeweiligen Referenzmessung in Abwesenheit von Lipidvesikeln wird zudem eine signifikante Inhibierung der Proteinaggregation im gesamten untersuchten Temperaturbereich bei pH 7,4 beobachtet, während bei pH 1,9 der inhibitorische Effekt nur im Temperaturbereich um den Hauptübergang des Lipids signifikant ist.

Abhängigkeit der Aggregationskinetik von der Kettenlänge verschiedener gesättigter Lipide

Die Abhängigkeit der Aggregationskinetik von Insulin von der Kettenlänge verschiedener ungesättigter Lipide wurde anhand des Zusatzes von DMPC-, DPPC- bzw. DSPC-Vesikeln bei 60 °C und pH 1,9 bzw. pH 7,4 untersucht (Abbildung 5.18). Für die Referenzmessungen ohne Lipid ist zunächst festzustellen, dass die Aggregation jeweils in Abwesenheit von 0,1 M NaCl drastisch (vgl. dazu auch Abbildung 5.20) verlangsamt wird. Bei beiden pH-Werten trägt Insulin elektrische Nettoladungen, +6 bei pH 1,9 und -2 bei pH 7,4 [Hong 2006]. Wahrscheinlich beungünstigt die fehlende elektrostatische Abschirmung bei Abwesenheit von 0,1 M NaCl die Annäherung zwischen gleichnamig geladenen, teilweise entfalteten Insulinmolekülen – Voraussetzung für die Aggregation –, was sich in einer signifikanten Abnahme der Aggregationsgeschwindigkeit äußert.

Der Einfluss des Zusatzes der Lipidvesikel auf die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins ist sowohl stark vom pH-Wert als auch von der Anwesenheit von NaCl abhängig: So beeinflusst der Lipidzusatz bei pH 1,9 in Gegenwart von 0,1 M NaCl die Aggregationsgeschwindigkeit im Rahmen der statistischen Fehler nicht signifikant. Die Unabhängigkeit der Aggregationsgeschwindigkeit von Insulin von der Anwesenheit der Lipidvesikel bei pH 1,9 in Gegenwart von 0,1 M NaCl wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für die weiteren untersuchten Lipidsysteme (DOPC / DOPE und DOPC / DOPS; siehe Abbildungen 5.19 und 5.20) beobachtet.

Weitgehend unabhängig von der Kettenlänge des Lipids, führt dessen Zusatz bei pH 1,9 ohne NaCl zu einer signifikanten, etwa dreifachen Aggregationsbeschleunigung.

Bei pH 7,4 schließlich wird in Anwesenheit von 0,1 M NaCl mit steigender Kettenlänge des Lipids eine zunehmende Inhibierung der Aggregation beobachtet, wobei das kürzestkettige untersuchte Lipid, DMPC, die Aggregationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Referenzmessung nicht beeinflusst. Die *bulk*-Reaktion läuft wiederum sehr schnell ab.

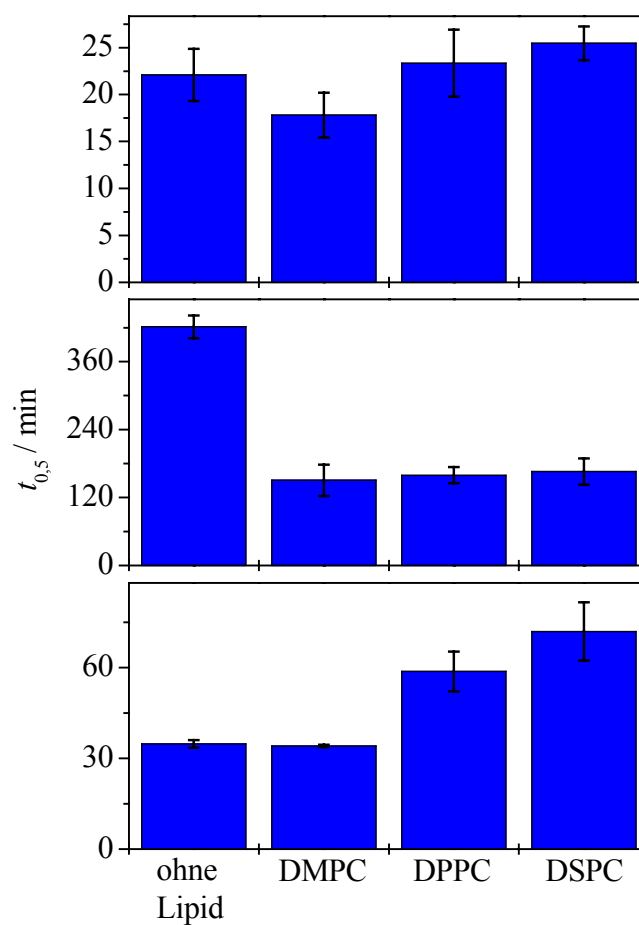


Abbildung 5.18: Einfluss der Kettenlänge verschiedener ungesättigter Lipide auf die Aggregationskinetik von 0,05 Gew.% Insulin bei 60 °C. Dargestellt sind die Zeiten für die halbmaximale Aggregation des Proteins bei 10-fachem molarem Lipidüberschuss, basierend auf der Auswertung des ThT-Assays, bei pH 1,9 mit 0,1 M NaCl (oben), bei pH 1,9 ohne NaCl (mittig) und bei pH 7,4 mit 0,1 M NaCl (unten). Proteinlösungen ohne Lipidvesikel, aber ansonsten gleichen Bedingungen, wurden zu Kontrollmessungen eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen jeweils statistische Fehler aus mindestens zwei unabhängigen Messungen dar.

Abhängigkeit der Aggregationskinetik vom DOPE-Anteil in DOPC / DOPE-Vesikeln

In Abbildung 5.19 ist der Einfluss des Anteils von DOPE in DOPC / DOPE-Vesikeln auf die Zeit für die halbmaximale Aggregation von Insulin bei 60 °C und pH 1,9 bzw. pH 7,4 dargestellt.

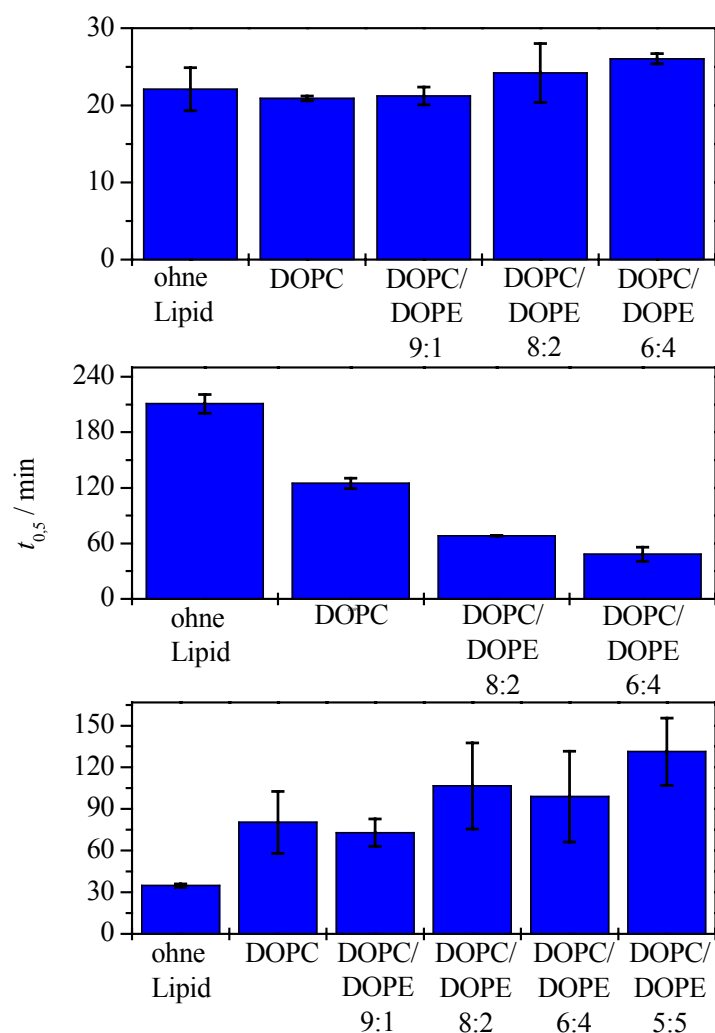


Abbildung 5.19: Einfluss des DOPE-Anteils in DOPC / DOPE-Vesikeln auf die Aggregationskinetik von 0,05 Gew.% Insulin bei 60 °C. Dargestellt sind die Zeiten für die halbmaximale Aggregation des Proteins bei 10-fachem molarem Lipidüberschuss, basierend auf der Auswertung des ThT-Assays, bei pH 1,9 mit 0,1 M NaCl (oben), bei pH 1,9 ohne NaCl (mittig) und bei pH 7,4 mit 0,1 M NaCl (unten). Proteinlösungen ohne Lipidvesikel, aber ansonsten gleichen Bedingungen, wurden zu Kontrollmessungen eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen jeweils statistische Fehler aus mindestens zwei unabhängigen Messungen dar.

Im Rahmen des Fehlers beeinflusst bei pH 1,9 der Zusatz der Lipidvesikel im Vergleich zur Referenzmessung nur bei Abwesenheit von NaCl die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins. Durch die Zugabe von reinen DOPC-Vesikeln wird die Aggregation etwa um den Faktor 2 beschleunigt. Enthalten die Lipidvesikel darüber hinaus DOPE, führt dessen Zugabe progressiv zu einer zusätzlichen signifikanten Aggregationsbeschleunigung, so dass beim höchsten untersuchten DOPE-Anteil (40 mol%) im Vergleich zur Referenzmessung eine vierfache Aggregationsbeschleunigung festzustellen ist.

Im Gegensatz dazu äußert sich bei pH 7,4 mit 0,1 M NaCl die Anwesenheit der Lipidvesikel in einer signifikanten Verringerung der Aggregationsgeschwindigkeit, wobei im Rahmen des Fehlers das Ausmaß dieses Effektes mit steigendem DOPE-Anteil nur sehr leicht zunimmt.

Abhängigkeit der Aggregationskinetik vom DOPS-Anteil in DOPC / DOPS-Vesikeln

In Abbildung 5.20 ist der Einfluss des Anteils von DOPS in DOPC / DOPS-Vesikeln auf die Zeit für die halbmaximale Aggregation von Insulin bei 60 °C und pH 1,9 bzw. pH 7,4 dargestellt. Bei pH 1,9 in Anwesenheit von 0,1 M NaCl ist kein signifikanter Effekt von DOPC / DOPS-Vesikeln auf die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins nachweisbar.

Die Abwesenheit von NaCl führt dagegen die Lipidzugabe zu einem deutlichen Anstieg der Aggregationsgeschwindigkeit in Bezug auf die Referenzmessung. Darüber hinaus macht sich ein steigender DOPS-Gehalt der Lipidvesikel durch eine zusätzliche Aggregationsbeschleunigung bemerkbar. Anzumerken ist die, im Vergleich zu den übrigen Messreihen bei pH 1,9 ohne NaCl, insgesamt langsamere Aggregationskinetik, die höchstwahrscheinlich aus der Verwendung unterschiedlicher Insulinchargen resultiert.

Ein diversifizierter Einfluss des Lipids auf die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins wird bei pH 7,4 in Anwesenheit von 0,1 M NaCl beobachtet, wo die Zugabe reiner DOPC-Vesikel im Vergleich zur Referenzmessung zu einer deutlichen Aggregationsinhibierung führt. Dieser inhibitorische Effekt wird im Rahmen des Fehlers jedoch bereits durch die Zugabe von 10-20 mol% DOPS kompensiert, so dass

sich oberhalb dieses DOPS-Anteils (bis 50 mol% DOPS) die Aggregationsgeschwindigkeiten von Referenz- und lipidhaltiger Probe nicht mehr unterscheiden.

Schließlich entfällt bei Abwesenheit von NaCl der aggregationsinhibierende Einfluss reiner DOPC-Vesikel, und oberhalb von 20 mol% DOPS verläuft die Aggregation mit steigendem DOPS-Gehalt zunehmend signifikant schneller.

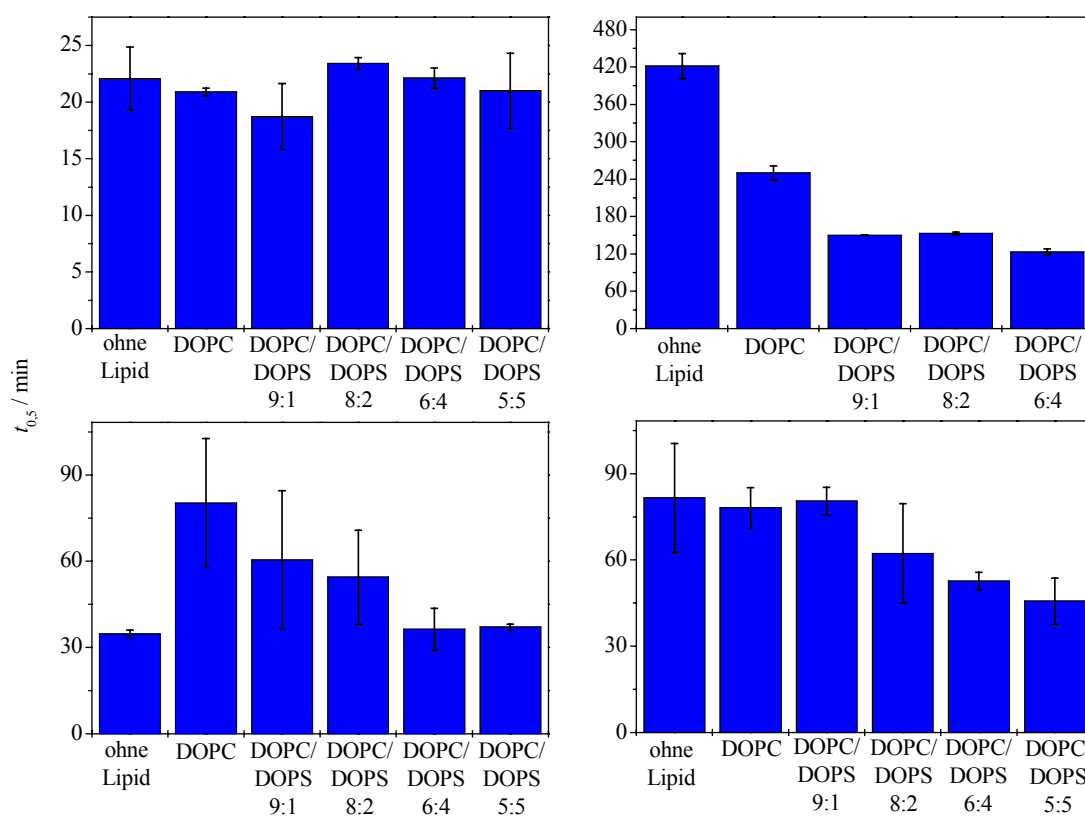


Abbildung 5.20: Einfluss des DOPS-Anteils in DOPC / DOPS-Vesikeln auf die Aggregationskinetik von 0,05 Gew.% Insulin bei 60 °C. Dargestellt sind die Zeiten für die halbmaximale Aggregation des Proteins bei 10-fachem molarem Lipidüberschuss, basierend auf der Auswertung des ThT-Assays, bei pH 1,9 mit (oben links) und ohne 0,1 M NaCl (oben rechts), sowie bei pH 7,4 mit (unten links) und ohne 0,1 M NaCl (unten rechts). Proteinlösungen ohne Lipidvesikel, aber ansonsten gleichen Bedingungen, wurden zu Kontrollmessungen eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen jeweils statistische Fehler aus mindestens zwei unabhängigen Messungen dar.

5.3.2 Diskussion der Ergebnisse

Über die Wechselwirkungen von Insulin mit Lipidmembranen existieren bisher nur wenig systematische, zum Teil widersprüchliche Untersuchungen. Für natives Insulin wurden schwache Wechselwirkungen mit Phosphatidylcholinen nachgewiesen, die vorwiegend elektrostatischer Natur zu sein und/oder die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Lipidkopfguppen zu umfassen scheinen [Omodeo-Sale 1987], [Pedersen 1999], [Fernández 2003]. Zudem wurden verstärkte attraktive elektrostatische Wechselwirkungen des Proteins mit negativ geladenen Modellmembranen beobachtet, die zum einen mit einer Vesikelfusion einher gehen [Farias 1986], sich zum anderen aber auch in einer beschleunigten Fibrillbildung äußern sollen [Zhao 2004]. Daneben ist eine Penetration von Lipidmonoschichten durch natives Insulin dokumentiert, deren Ausmaß mit dem Sättigungsgrad der Lipide und somit der Fluidität der Membran zu korrelieren scheint [Schwinke 1983]. Unter Bedingungen, unter denen häufig eine Aggregation des Proteins durch Entfaltung an der Luft-/Wasser-Grenzfläche beobachtet wird, wurde, unabhängig von der Wahl des Lipids, über eine ausschließlich aggregationsinhibierende Wirkung von Lipidzusätzen – allerdings in nicht-vesikulärer Form - berichtet [Hansen 1986]. Schließlich deutet eine FT-IR-Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Insulin unter Bedingungen, die denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ähneln (pH 1,6 bei 60 °C), auf eine beschleunigte Oberflächenaggregation, sowohl unter elektrostatischer Attraktion als auch Repulsion, im Vergleich zur Aggregation in der *bulk*-Phase hin [Sharp 2002].

Die Ergebnisse des ThT-Assays für die Aggregation von Insulin sollen im Folgenden vor dem Hintergrund der bisher bekannten Phänomene der Proteinaggregation in Anwesenheit von Lipidmembranen diskutiert werden.

Aggregationskinetik im Temperaturbereiches des Phasenüberganges von DSPC

Es ist bekannt, dass Lipidmembranen im Bereich um die Hauptübergangstemperatur von der Gel- in die fluide Phase ausgeprägte Diskontinuitäten verschiedener physikalischer Parameter, wie zum Beispiel der Permeabilität, aufweisen, die in der Regel am Phasenübergang ein Maximum durchläuft [Lasic 1993]. Als eine wesentliche Ursache dieses Effektes wird das maximale Auftreten von Defekten an der Grenzfläche zwischen koexistierenden Domänen in der Gel- und der fluiden Phase im Zuge derer

hochgradig dynamischen wechselseitigen Umwandlung angenommen. Solche Defekte könnten im Falle der Insulinaggregation eine partielle Insertion teilweise entfalteter Proteinmoleküle begünstigen und dadurch exponierte hydrophobe Proteinbereiche vor nicht-nativen Protein-Protein-Wechselwirkungen abschirmen. In einem solchen Szenario wäre eine damit verbundene Abnahme der Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins in der Nähe des Gel-Fluid-Phasenüberganges (siehe Abbildung 5.17) durchaus zu erwarten [Gorbenko 2006]. Allerdings kann eine mögliche Proteininsertion in die Membran aus den vorliegenden Daten nicht direkt gefolgert werden und müsste, z. B., anhand von AFM- oder Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen belegt werden.

Abhängigkeit der Aggregationskinetik von der Kettenlänge verschiedener gesättigter Lipide

Aus der Unabhängigkeit der Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins bei 60 °C und 0,1 M NaCl, pH 1,9, von der Lipidkettenlänge (siehe Abbildung 5.18) könnte zum einen gefolgert werden, dass unter diesen Bedingungen Insulin keinerlei Wechselwirkungen mit den untersuchten Modellbiomembranen eingeht. Zum anderen müssen aber auch die Limitationen des ThT-Assays diskutiert werden: Der Assay erfasst die Bildung fibrillärer Aggregate, unabhängig von deren Bildungsort, d.h., allein auf der Grundlage des ThT-Assays kann nicht zwischen der Aggregation des Proteins in der *bulk*-Lösung und der Aggregation in der Nähe der Membran unterschieden werden. Bei 60 °C und pH 1,9 in Anwesenheit von 0,1 M NaCl befindet sich Insulin unter Bedingungen, bei denen die teilweise Entfaltung von Insulinmolekülen, aber auch – durch die verminderte elektrostatische Abstoßung – deren Aggregation stark favorisiert wird. Offenbar verläuft die *bulk*-Aggregation im Vergleich zur Aggregation in der Nähe von Membranen unter diesen Bedingungen so schnell, dass die im ThT-Assay beobachtbare Netto-Aggregationsgeschwindigkeit hauptsächlich durch die *bulk*-Aggregationsgeschwindigkeit bestimmt wird.

Die Aggregation in der *bulk*-Lösung verläuft bei Abwesenheit von NaCl um eine Größenordnung langsamer, so dass sich der Beitrag der Aggregation des Proteins in der Nähe der Membran in einem Einfluss auf die Netto-Aggregationsgeschwindigkeit äußern kann. Die Tatsache, dass unabhängig von der Kettenlänge des ungesättigten Lipids ein gleiches Ausmaß an Aggregationsbeschleunigung beobachtet wird, spricht

gegen eine signifikante Wechselwirkung des Proteins mit dem hydrophoben Inneren der Modellmembranen unter diesen Bedingungen. Wahrscheinlich resultiert die Aggregationsbeschleunigung aus attraktiven Wechselwirkungen von Insulin mit der Membranoberfläche im Kopfgruppenbereich der Lipide und / oder möglicherweise einer, durch die Freisetzung von Hydratwasser, entropiegetriebenen Membranassoziation [Sharp 2002]. Bei pH 1,9 sollten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen permanenten Ladungen des Proteins und solchen der Lipidkopfgruppen nur eine untergeordnete Rolle spielen, denn obwohl Insulin netto hochgradig positiv geladen ist, ist die Membran aufgrund des geringen pK_a -Wertes der Lipid-Phosphatgruppen ($pK_a < 1$) größtenteils elektrisch neutral. Dem gegenüber könnten aufgrund des dipolaren Charakters der Lipidkopfgruppen attraktive Dipol-Monopol-, Dipol-Dipol- oder Wasserstoffbrückenbindungs-Wechselwirkungen eine reversible Adsorption partiell entfalteter Insulinmoleküle an der Membranoberfläche begünstigen [Gorbenko 2006]. Eine damit einhergehende lokale Konzentrationserhöhung teilweise entfalteter Insulinmoleküle sollte sich aufgrund der stark konzentrationsabhängigen Keimbildung zur Initiierung des Aggregationsprozesses in einer Aggregationsbeschleunigung äußern.

Bei pH 7,4 schließlich trägt Insulin zwei negative Nettoladungen, wohingegen die Lipide in zwitterionischer Form vorliegen. Eine reversible Proteinadsorption über Dipol-Monopol-, Dipol-Dipol und Wasserstoffbrückenbindungs-Wechselwirkungen erscheint auch in diesem Fall realistisch, kann allerdings nicht die systematische Abnahme der Aggregationsgeschwindigkeit mit zunehmender Kettenlänge des Lipids erklären. Möglicherweise liefert eine partielle Insertion von Insulin in die Membran eine Erklärung für den inhibitorischen Effekt der Lipide, unter anderem vor dem Hintergrund, dass sich das jeweilige Lipidsystem mit steigender Lipidkettenlänge an die Hauptübergangstemperatur annähert, bei der eine partielle Insertion favorisiert zu sein scheint. Darüber hinaus ist bekannt, dass die transmembrane Insertion von Proteinen in subtiler Weise vom Ausmaß des „hydrophobic matching“, d. h., der Übereinstimmung zwischen der Dicke des transmembranen hydrophoben Bereiches des Proteins und der hydrophoben Dicke der Lipiddoppelschicht, reguliert werden kann [Jensen 2004]. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung weisen DMPC-Lipiddoppelschichten die geringste hydrophobe Dicke auf [Cantor 1999], so dass die vorliegenden Daten auf ein

benötigtes Mindestmaß an „hydrophobic matching“ zwischen Insulin und der Membran zur partiellen Insertion hinweisen könnten.

Abhängigkeit der Aggregationskinetik vom DOPE-Anteil in DOPC / DOPE-Vesikeln

Wie bereits beim Zusatz der gesättigten Lipide diskutiert, dominiert offenbar die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins in der *bulk*-Phase die beobachtbare Netto-Aggregationsgeschwindigkeit bei pH 1,9 bei Zusatz von 0,1 NaCl, so dass kein Effekt des Lipidzusatzes auf die Aggregationsgeschwindigkeit festzustellen ist (siehe Abbildung 5.19).

Ohne NaCl wird bei pH 1,9 die deutliche Aggregationsbeschleunigung bei Vesikelzusatz die möglicherweise durch eine unspezifische Oberflächenanreicherung, allerdings ohne signifikante Insertion, des Proteins hervorgerufen. Der additive, aggregationsbeschleunigende Einfluss von DOPE könnte eine verstärkte Oberflächenanreicherung von Insulin im Vergleich zu reinen DOPC-Vesikeln implizieren. Es ist bekannt, dass der Einbau von DOPE in DOPC-Vesikel aufgrund der kleineren Kopfgruppe zum Aufbau von elastischem Krümmungsstress innerhalb der Membran führt. Die Bindung von Proteinen an solche Membranen kann eine Stress-Relaxation innerhalb der Membran bewirken, wodurch demnach Protein-Membran-Wechselwirkungen bei Anwesenheit von DOPE thermodynamisch favorisiert werden können [Stubbs 1996], [Hui 1997]. In analoger Weise wurde der Abbau von Krümmungsstress als eine wesentliche Triebkraft der Wechselwirkung zwischen dem amyloidogenen Protein α -Synuclein und stark gekrümmten kleinen unilamellaren Phospholipid-Vesikeln identifiziert [Nuscher 2004].

Der inhibitorische Effekt der Lipidvesikel bei pH 7,4 in Anwesenheit von 0,1 M NaCl, der nur leicht durch den Einbau von DOPE verstärkt wird, scheint wiederum auf eine partielle Membraninsertion des Proteins hinzudeuten. Auffällig ist die Beobachtung, dass ein ähnliches Ausmaß an Inhibition für reine DOPC-Vesikel wie für reine DSPC-Vesikel unter denselben Bedingungen beobachtet wird (vgl. Abbildung 5.18). Während sich allerdings DSPC bei 60 °C knapp unterhalb des Gel-Fluid-Phasenüberganges befindet, sollte DOPC, dessen Hauptübergangstemperatur unter diesen Bedingungen bei ca. -20 °C liegt, vollständig in der fluiden Phase vorliegen [Koyonova 1998]. DMPC

andererseits, dessen Hauptübergangstemperatur bei ca. 24 °C liegt, sollte sich ebenfalls bei 60 °C in der fluiden Phase befinden, hat aber im Gegensatz zu DOPC unter denselben Bedingungen keinen Einfluss auf die Aggregationsgeschwindigkeit. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass neben der Fluidität der Modellmembran auch die Komposition der Acylketten das Ausmaß einer möglichen Membraninsertion von teilweise entfaltetem Insulin – möglicherweise über „hydrophobic matching“ - modulieren kann.

Abhängigkeit der Aggregationskinetik vom DOPS-Anteil in DOPC / DOPS-Vesikeln

Wie beim Zusatz verschiedener gesättigter Lipide als auch beim Zusatz ungesättigter DOPC / DOPE-Lipidmischungen dokumentiert, dominiert offenbar die Geschwindigkeit der bulk-Aggregation die Netto-Aggregationsgeschwindigkeit des Protein / Lipid-Systems bei pH 1,9 in Gegenwart von 0,1 M NaCl (siehe Abbildung 5.20).

Die mögliche Oberflächenanreicherung von Insulin in Gegenwart von DOPC-Vesikeln als eine Ursache für den beschleunigenden Effekt der Vesikelzugabe bei pH 1,9 ohne NaCl wurde bereits diskutiert. Obwohl DOPS bei neutralem pH-Wert aufgrund seiner Carboxylatgruppe negativ geladen ist, sollte dessen Einbau in DOPC-Vesikel die Ladungsverhältnisse innerhalb der Membran bei pH 1,9 nur unwesentlich ändern, da bei diesem pH-Wert die Carboxylatgruppe protoniert vorliegt. Die Carboxylgruppe könnte aber die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen mit Insulinmolekülen ermöglichen, und tatsächlich wurde eine direkte Wechselwirkung von Carbonsäuren (im konkreten Fall: Essigsäure) mit Insulin unter ähnlichen Bedingungen wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit postuliert [Dzwolak 2004c]. So könnte beispielsweise eine Komplexierung polarer exponierter Proteinbereiche durch die Carboxylgruppe unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu einem stärkeren Ausmaß an Oberflächenadsorption führen.

Bei pH 7,4 liegt DOPS vorwiegend in anionischer Form vor. Eine Wechselwirkung zwischen netto zweifach negativ geladenen Insulinmolekülen und der Membran bei pH 7,4 sollte mit zunehmender negativer Ladungsdichte beim Einbau von DOPS aus rein elektrostatischer Sicht beungünstigt werden. Insofern würde sich die Beobachtung,

dass sich bei Anwesenheit von DOPC / DOPS-Lipidvesikeln mit steigendem DOPS-Anteil die Aggregationsgeschwindigkeit in Anwesenheit von 0,1 M NaCl an die in der *bulk*-Phase angleicht, mit den Erwartungen im Rahmen der vorliegenden Untersuchung decken. Dieser Effekt sollte jedoch aufgrund der erhöhten Ladungsabschirmung eher bei Ab- als bei Anwesenheit von 0,1 M NaCl zu erwarten sein. Tatsächlich deutet jedoch der aggregationsbeschleunigende Effekt eines erhöhten DOPS-Anteils in Abwesenheit von NaCl wahrscheinlicher auf ein zunehmendes Ausmaß an der Anreicherung des Proteins an der Vesikeloberfläche hin. Unter ähnlichen, salzfreien Bedingungen wurde – allerdings bei 25 °C – eine Aggregationsbeschleunigung in Gegenwart von Lipidsystemen mit negativer Ladungsdichte an der Oberfläche dokumentiert [Zhao 2004]. Die Autoren dieser Studie schreiben den aggregationsbeschleunigenden Effekt des Vesikelzusatzes in diesem Fall einer Anreicherung des Proteins infolge von attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen lokal positiv geladenen Proteinbereichen und der netto negativ geladenen Membranoberfläche zu. Eine dazu gegensätzliche Argumentation liefern Sharp *et al.*, die ebenfalls unter netto repulsiven elektrostatischen Bedingungen eine, im Vergleich zur *bulk*-Lösung, beschleunigte Aggregation von Insulin in Gegenwart von Lipidmembranen beobachtet haben [Sharp 2002]. Unter solchen Bedingungen könne eine enthalpisch ungünstige repulsive Wechselwirkung zwischen dem Protein und der Membran nur durch eine starke Entropiezunahme des Proteins kompensiert werden, die aus einer bevorzugten Entfaltung des Proteins resultieren könne. Der damit einhergehende höhere Anteil aggregationsanfälliger, teilweise entfalteter Insulinmoleküle könnte in diesem Szenario die Zunahme der Aggregationsgeschwindigkeit erklären.

Letztendlich bleibt die tatsächliche Ursache für den aggregationsbeschleunigenden Einfluss von DOPC / DOPS-Vesikeln bei pH 7,4 nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse des ThT-Assays sollten daher durch Ergebnisse struktureller Untersuchungsmethoden, wie z. B. oberflächensensitive ATR- (attenuated total reflection)-FT-IR-Untersuchungen, ergänzt werden, um auch Aussagen über mögliche konformelle Unterschiede des Proteins in verschiedenen Membranumgebungen treffen zu können. Darüber hinaus könnten AFM-Untersuchungen auf morphologischer Basis Hinweise auf bevorzugte, alternative Aggregationspfade liefern, die unter dem Einfluss verschiedener Membransysteme favorisiert werden. Schließlich fehlen zur

abschließenden Diskussion auch Informationen über den Einfluss des aggregierenden Proteins auf die physikalischen Eigenschaften der Lipidmembranen. In diesem Zusammenhang würden sich fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Membranstabilität und -integrität in Gegenwart des Proteins als wertvoll erweisen.

6 Zusammenfassung

Das Phänomen der Proteinefehlfaltung sowie die damit eng assoziierten Phänomene der Proteinaggregation und Amyloidbildung stellen derzeit zentrale Aspekte der Proteinforschung dar. Grundlagentheoretisch ist deren Erforschung durch ein Interesse an den molekularen Zusammenhängen zwischen kompetitiven Faltungsstrategien – nativer Faltung und nicht-nativer Selbstassoziation – motiviert. Darüber hinaus sind das Verständnis und letztlich die Reduzierung unerwünschter Aggregationsprozesse von großer Relevanz bei Herstellung, Transport und Lagerung technologischer Produkte auf Proteinbasis, wie beispielsweise Pharmaka. Schließlich stellt die Beteiligung fehlgefalteter Proteine an einer Reihe, z. T. schwerwiegender, Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit oder Typ-2-Diabetes, eine Herausforderung für ein tiefergehendes Verständnis der pathogenen Auswirkungen von Proteinefehlfaltungsprozessen *in vivo* dar.

Nicht nur seine Eigenschaften als kleines, amyloidogenes Modellprotein, sondern auch das Auftreten von Amyloidaggregaten im Zusammenhang mit der Behandlung von Diabetes, machen Insulin zu einem geeigneten Kandidaten zur Erforschung von Proteinaggregationsprozessen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher das Aggregationsverhalten von Rinderinsulin unter einer Reihe variabler Umgebungsparameter systematisch mit Hilfe fluoreszenz- (Anisotropiemessungen und ThT-Assay), CD- und UV-spektroskopischer Methoden untersucht.

Einfluss von Cosolventien auf das Aggregationsverhalten von Insulin

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Aggregation von Insulin unter variablen Lösungsmittelbedingungen bei pH 1,9 untersucht, wobei EtOH sowie TFE einerseits und Glycerol andererseits zur Modellierung destabilisierender bzw. stabilisierender Lösungsmittelbedingungen für das native Protein eingesetzt wurden. Die Modulation der Lösungsmittelbedingungen äußert sich in diversifizierten strukturellen und kinetischen Effekten auf die Entfaltung, die nicht-native Selbstassoziation und die Fibrillbildung des Proteins. Mittels Fluoreszenzanisotropie- und CD-Untersuchungen konnte mit zunehmenden EtOH- und TFE-Konzentrationen bei Raumtemperatur eine

Destabilisierung und Dissoziation nativer Insulinoligomere aufgrund des chaotropen Charakters der beiden Monoalkohole nachgewiesen werden. Dem gegenüber führt die Zugabe von Glycerol als kosmotropem Cosolvens durch bevorzugte Hydratation zu einer Stabilisierung und Kompaktisierung nativer Insulindimere.

Bei höheren Temperaturen aggregieren teilweise entfaltete Insulinmonomere in einem Keimbildungs-abhängigen Aggregationsprozess. Bei hohen EtOH- und TFE-Konzentrationen stellt die Bildung oligomerer Aggregationskeime den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Aggregationsprozesses dar, während bei kleinen Konzentrationen der Monoalkohole sowie in Glycerol die Dissoziation von Insulindimeren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Unter Zuhilfenahme des ThT-Fluoreszenzassays und der CD-Spektroskopie wurde der gesamte Aggregationsprozess kinetisch und strukturell analysiert. Aufgrund der vermehrten Bildung partiell entfalteter Insulinmonomere wird die Proteinaggregation bei kleinen EtOH- und TFE-Konzentrationen beschleunigt. Bei höheren Konzentrationen wird dagegen eine zunehmende Aggregationsinhibierung beobachtet. Die Abschwächung hydrophober Wechselwirkungen und eine verminderte Ladungsabschirmung bei der Annäherung hochgradig positiv geladener, teilweise entfalteter Insulinmonomere während der Keimbildung sind wahrscheinlich hauptverantwortlich für den aggregationshemmenden Einfluss höherer Alkoholkonzentrationen. Der Zusatz von Glycerol wirkt sich dagegen aufgrund der Erhöhung der Aktivierungsenergie zwischen nativen Insulindimeren und teilweise entfalteten, monomeren Proteinspezies mit steigender Konzentration ausschließlich aggregationsverlangsamend aus.

Obwohl unter allen untersuchten Lösungsmittelbedingungen die Aggregation des Proteins mit der Ausbildung eines hohen Anteils intermolekularer β -Faltblattstrukturen einher geht, konnte unter Verwendung des hydrophoben Farbstoffes 1,8-ANS UV-spektroskopisch eine unterschiedliche Oberflächenhydrophobizität der resultierenden Insulinaggregate beobachtet werden. Ein zunehmendes Ausmaß an struktureller Unordnung im teilweise entfalteten Zustand, und, damit verbunden, eine vermehrte Exponierung hydrophober Proteinbereiche führt bei hohen EtOH- und TFE-Konzentrationen vermutlich zur Ausbildung hydrophober Cluster mit erhöhter ANS-

Affinität an der Aggregatoberfläche. Morphologisch äußert sich diese Tatsache letztendlich in einer Abnahme des Anteils fibrillärer Aggregate zu Gunsten amorpher Aggregate. Auf der anderen Seite werden bei Zugabe von Glycerol ausschließlich fibrilläre Aggregate mit einer geringeren Oberflächenhydrophobizität beobachtet, die aus der Ausbildung wohlgeordneter intermolekularer Kontakte zwischen stärker strukturierten, teilweise entfalteten Insulinmonomeren resultieren.

Einfluss von Druck auf das Aggregationsverhalten von Insulin

Aus Untersuchungen des druckabhängigen Aggregationsverhaltens von Insulin in Gegenwart von EtOH und der unterschiedlichen Druckstabilität von Insulinaggregaten bei pH 1,9 wurden wertvolle Beiträge zum Verständnis der Hydratation und der Packung von aggregierten Insulinspezies, die auf unterschiedlichen Aggregationspfaden gebildet werden, erhalten. Darüber hinaus konnten durch eine Analyse der Aggregationskinetik unter Druck neue Einsichten in volumetrische Charakteristika der Übergangszustände zwischen den verschiedenen, am Aggregationsprozess beteiligten, Proteinspezies gewonnen werden. Die wesentlichen Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 6.1 zusammengefasst.

In Abhängigkeit von der Wahl der Lösungsmittel- und Druckbedingungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei alternative Aggregationspfade für Insulin beobachtet. Der bereits dokumentierte Fibrillbildungspfad beginnt mit der Dissoziation nativer Insulindimere, die unter Druck und in Anwesenheit von EtOH begünstigt wird. Bei höheren Temperaturen erfolgt eine, mit einer Volumenzunahme verbundene, partielle Entfaltung des Monomers, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fibrillbildung bei hohen Drücken in Abwesenheit von EtOH darstellt und zur Inhibierung der Aggregation oberhalb von ca. 1 kbar führt. Bei moderaten Drücken wird jedoch die Fibrillbildung beschleunigt, da die langsame reversible Keimbildung und das anschließende, im Wesentlichen irreversible, Fibrillwachstum über kompakte und / oder nur gering hydratisierte Übergangszustände verlaufen. Die Beobachtung, dass die resultierenden Aggregate in Drucksprunguntersuchungen bis zu 2 kbar druckunempfindlich sind, deutet auf ein ausgedehntes Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk und eine optimierte Packung der Protein-Seitenketten innerhalb der Amyloidfibrillen hin.

Unter besonderen Bedingungen, nämlich in Abwesenheit von EtOH, bei Drücken < 200 bar, unter elektrostatischer Abschirmung (bei Zusatz von 0,1 M NaCl) sowie unter Diffusionskontrolle, steht partiell entfalteten Insulinmonomeren bei hohen Temperaturen ein neuartiger Aggregationspfad offen. Dieser führt zur reversiblen Bildung amorpher, ThT-positiver „off pathway“-Aggregate. Im Vergleich zur Keimbildung auf dem Fibrillbildungspfad verläuft unter diesen Bedingungen die Bildung der „off pathway“-Aggregate so schnell, dass deren Bildung mit Hilfe des ThT-Assays verfolgt werden kann, wobei ein doppelt-sigmoidales zeitliches Profil der ThT-Emission beobachtet wird. Die Verlangsamung sowie die Unterdrückung der Bildung von „off pathway“-Aggregaten bei Drücken oberhalb von 200 bar resultieren vermutlich aus unkompensierten Packungsdefekten an der Monomer-Monomer-Kontaktfläche innerhalb der Oligomere, womit positive Reaktions- und Aktivierungsvolumina für die Aggregation einher gehen. Darüber hinaus impliziert die Anfälligkeit der „off pathway“-Aggregate für eine druckinduzierte Dissoziation, dass elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen wesentlich zur Stabilisierung dieser Spezies beitragen. Temperatur- und druckabhängige Untersuchungen der Dissoziationskinetik lassen darauf schließen, dass die Umkehrung des Aggregationsprozesses für „off pathway“-Aggregate unter moderaten Drücken und bei Umgebungstemperatur technologisch durchaus möglich ist. Allerdings werden oberhalb von etwa 30 °C die dissoziierten Spezies – wahrscheinlich Insulinmonomere – kinetisch labil und können auf dem Fibrillbildungspfad re-aggregieren, so dass die „off pathway“-Aggregate bei erhöhten Temperaturen als reversibles Proteinreservoir für den Fibrillbildungspfad angesehen werden können.

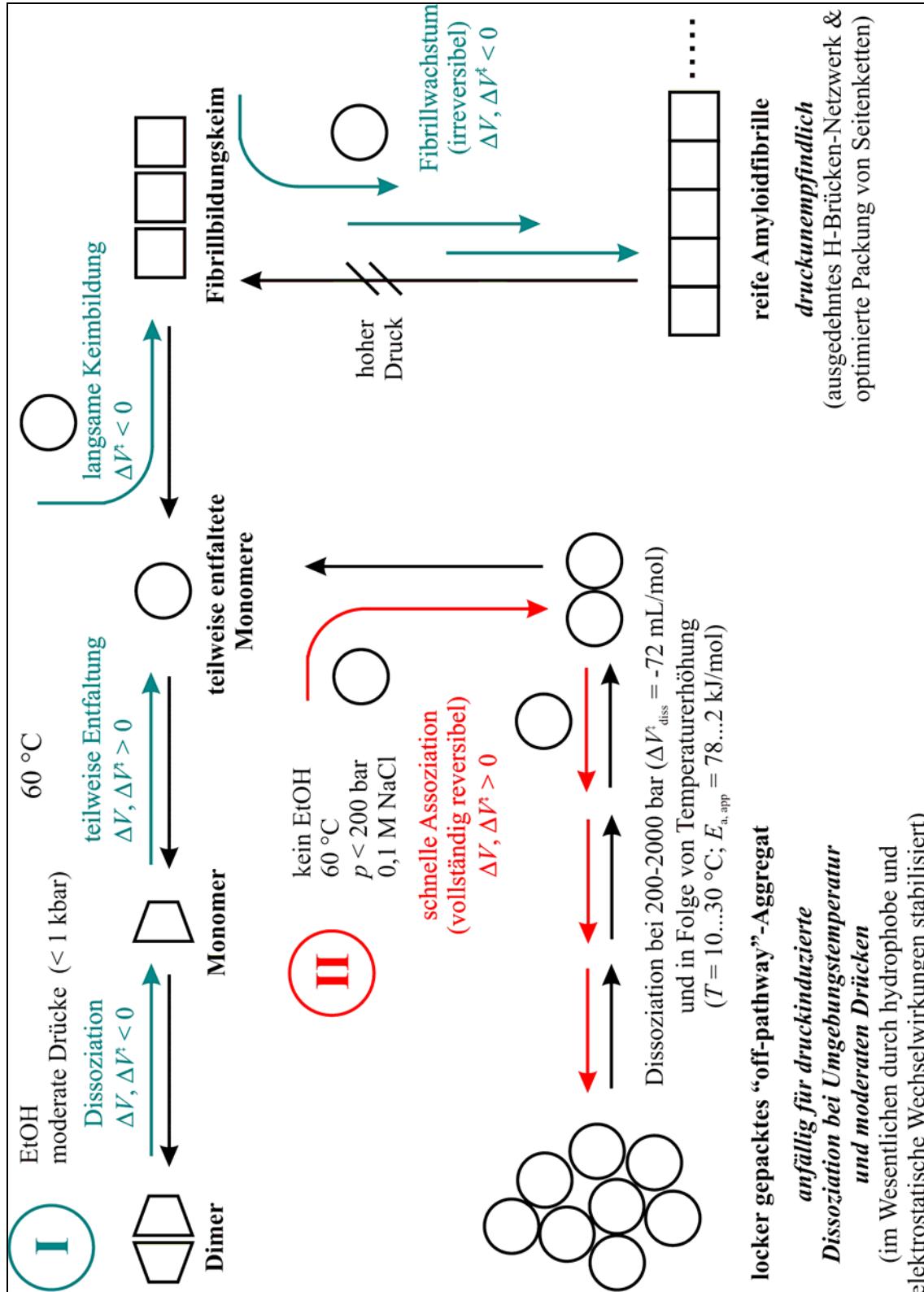


Abbildung 6.1: Vereinfachtes hypothetisches Schema zum Einfluss von Temperatur, Druck und Cosolvenszusatz auf die Aggregations- und Fibrillbildungspfade von Insulin. (I) Fibrillbildungspfad (blau); (II) alternativer, reversibler „off pathway“.

Einfluss von Modellbiomembranen auf das Aggregationsverhalten von Insulin

In stark vereinfachender Anlehnung an die Situation *in vivo*, in der im Zusammenhang mit Proteinfehlfaltungskrankheiten fibrilläre Proteinaggregate häufig in Assoziation mit Zellmembranen gefunden werden, wurde die Aggregationskinetik von Insulin in Gegenwart unterschiedlicher Modellbiomembranen mittels des ThT-Assays untersucht. In Abhängigkeit vom pH-Wert und der Anwesenheit von 0,1 M NaCl, beeinflussen die Lipiddynamik in der Nähe des Gel-Fluid-Phasenüberganges, die Kettenlänge ungesättigter Lipide sowie der Einbau von DOPE bzw. DOPS in DOPC-Vesikel die Aggregationskinetik in indifferenter, aggregationsbeschleunigender oder –inhibierender Weise.

Bei Zusatz von NaCl scheint in den meisten Fällen bei pH 1,9 die *bulk*-Aggregationsgeschwindigkeit die Aggregationskinetik zu dominieren. Allerdings erlaubt das dynamische Auftreten von Membran-Defektstellen in der Nähe des Phasenüberganges wahrscheinlich die partielle Insertion des Proteins, die zur Abschirmung exponierter Proteinbereiche und schließlich zur Aggregationsinhibierung führen könnte. In Abwesenheit von NaCl wurde ein ausschließlich aggregationsbeschleunigender Effekt der verschiedenen Lipidzusätze beobachtet, der vermutlich auf einer Anreicherung des Proteins an der Membranoberfläche beruht. Neben schwachen Dipol-Dipol, Dipol-Monopol und Wasserstoffbrückenbindungs-Wechselwirkungen könnten der Abbau von Krümmungsstress in DOPC / DOPE-Membranen und bevorzugte Wechselwirkungen mit Carboxylgruppen in DOPC / DOPS-Membranen in diesen Fällen eine zusätzliche Oberflächenanreicherung begünstigen.

Bei pH 7,4 scheint tendenziell eine partielle Insertion von Insulin in die Lipidmembranen favorisiert zu sein, was den inhibitorischen Effekt aller untersuchten, mit Ausnahme der DOPS-haltigen, Modellmembranen auf den Aggregationsprozess erklären könnte. Dabei wächst das Ausmaß der Inhibierung mit einer Annäherung an die gel-fluid-Phasenübergangstemperatur gesättigter Lipide, deren Kettenlänge sowie dem Ausmaß an Krümmungsstress ungesättigter Lipidmischungen. Der beschleunigende Einfluss von DOPS auf die Aggregationsgeschwindigkeit des Proteins unter netto repulsiven elektrostatischen Bedingungen konnte nicht vollständig erklärt

werden und resultiert möglicherweise aus einer Oberflächenanreicherung und /oder schnellerer /stärkerer Entfaltung des Proteins ohne anschließende Membraninsertion.

7 Anhang

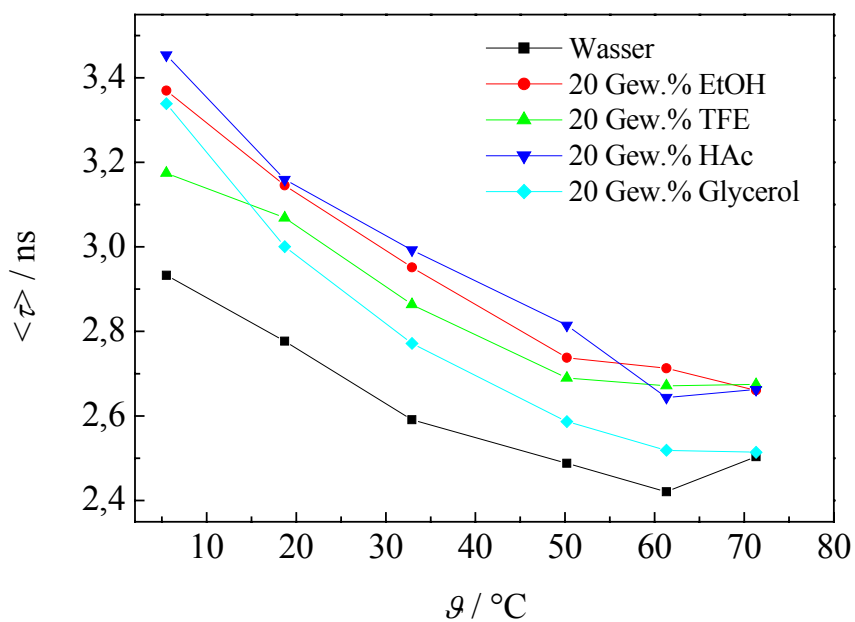


Abbildung 7.1: Darstellung der Temperaturabhängigkeit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von Alexa 488-C₅-Maleinimid in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 in verschiedenen Lösungsmittelsystemen. Die Ergebnisse basieren auf einer Analyse zeitaufgelöst gemessenen Fluoreszenzdaten (Phasenverschiebung und Demodulationsgrad) mit der *Globals Unlimited*-Software unter der Annahme eines biexponentiellen Modells zur Beschreibung des Abklingverhaltens der Fluoreszenz.

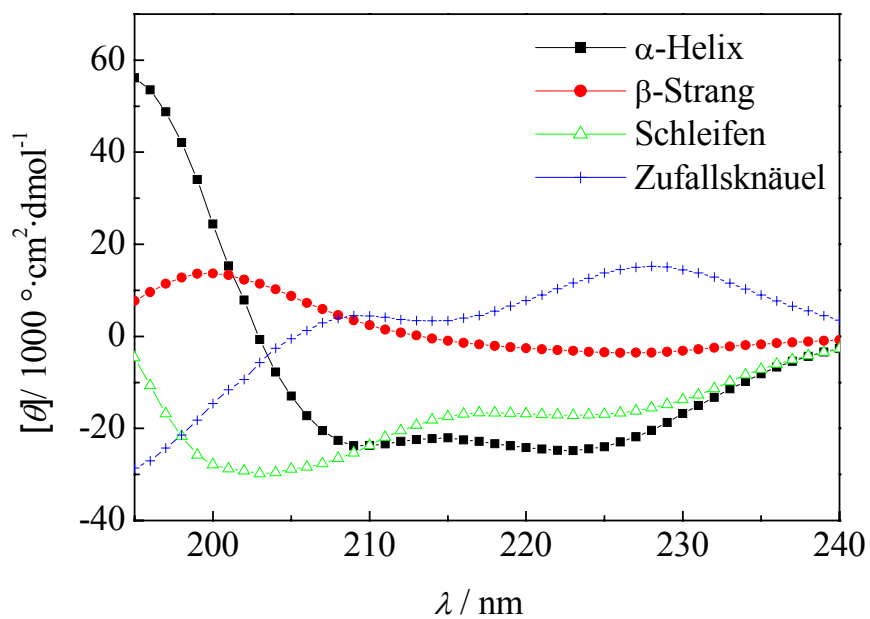


Abbildung 7.2: Repräsentative Spektren für die reinen Sekundärstrukturelemente als Ergebnis der CCA-Dekonvolution des CD-Spektrums von 0,25 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 20 °C.

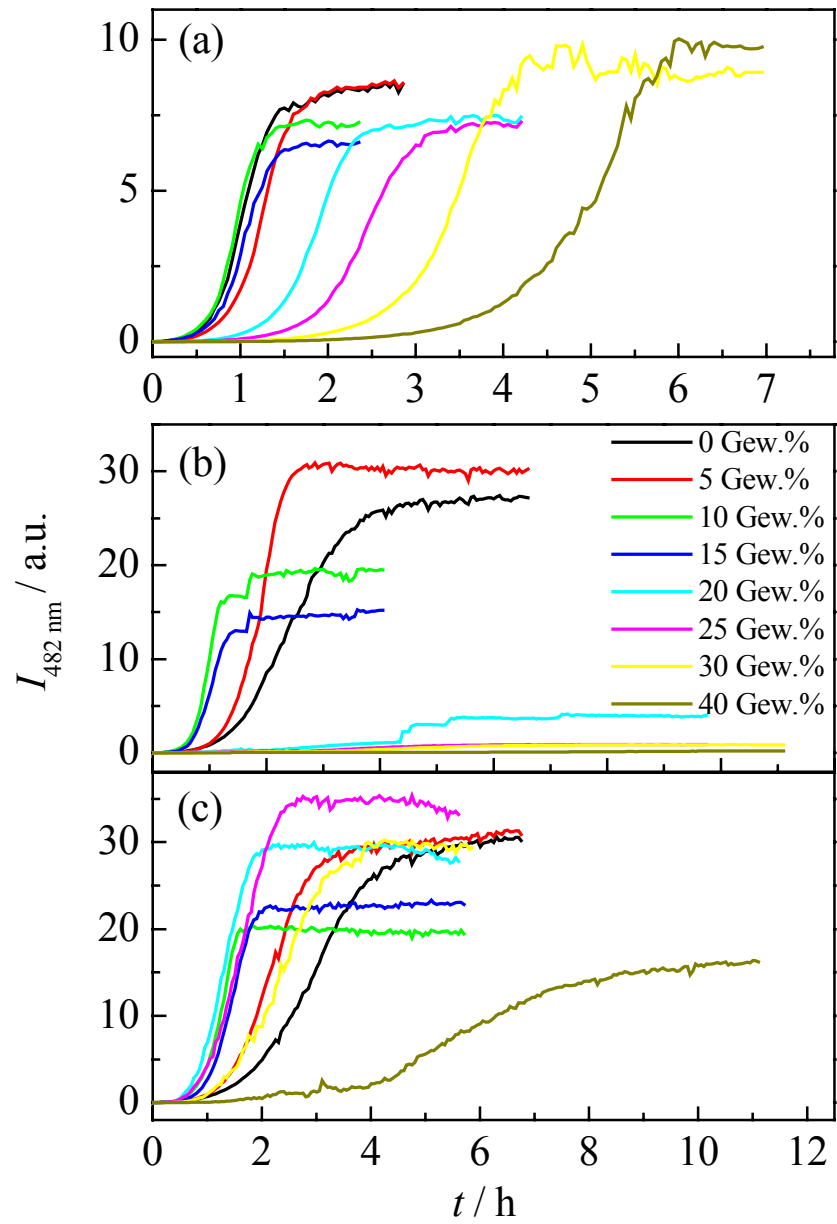


Abbildung 7.3: Zeitliche Entwicklung der ThT-Fluoreszenz für die Aggregation von 0,5 Gew.% Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 und 50 °C bei verschiedenen Konzentrationen von Glycerol (a), EtOH (b) und TFE (c).

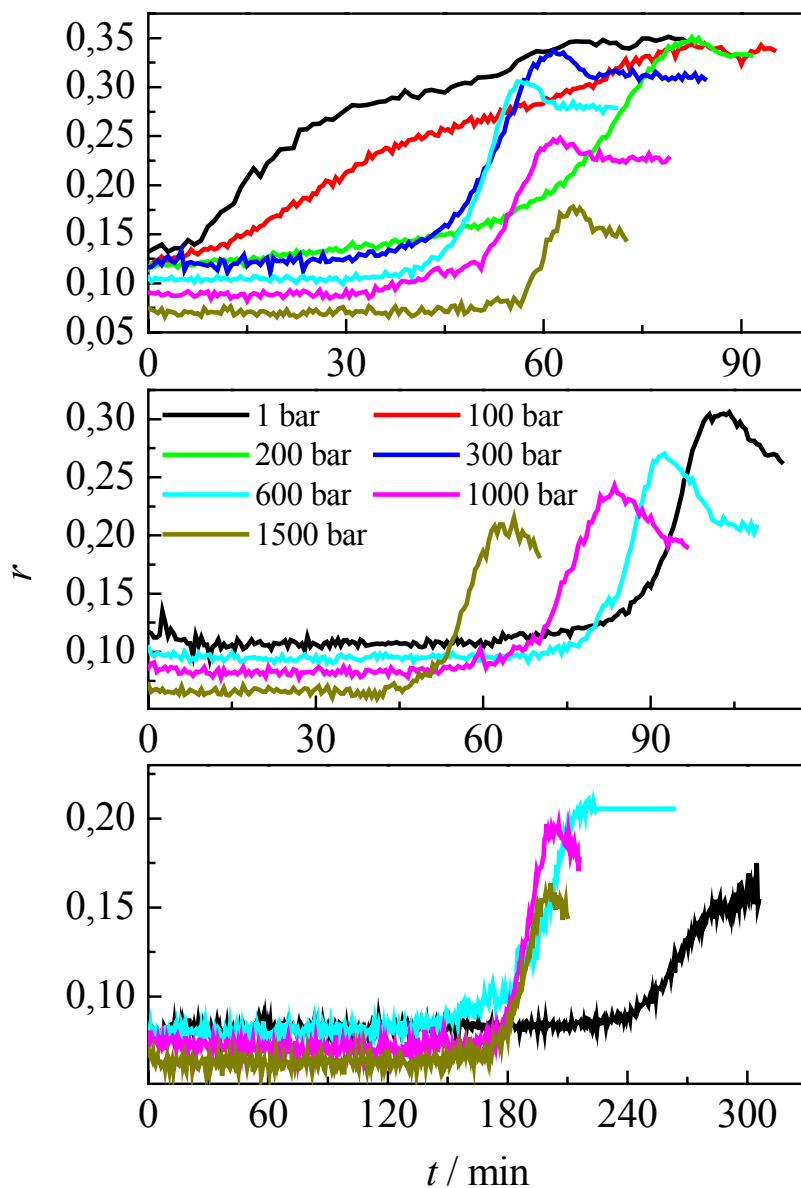


Abbildung 7.4: Druckabhängigkeit der zeitlichen Entwicklung der Fluoreszenzanisotropie von 0,5 Gew.% Alexa 488-markiertem Insulin in 0,1 M NaCl bei 60 °C in rein wässriger Lösung (oben), in 5 Gew.% EtOH (mittig) und in 20 Gew.% EtOH. Die anfänglichen Anisotropiewerte wurden zur Berechnung der scheinbaren hydrodynamischen Volumina von Insulin zu Beginn der Aggregation verwendet. Die Abnahme der Anisotropie zu späten Aggregationszeitpunkten resultiert vermutlich vor allem aus Selbst-Depolarisationsprozessen infolge von Resonanzenergietransfer zwischen Alexa 488-Fluorophoren im Aggregat.

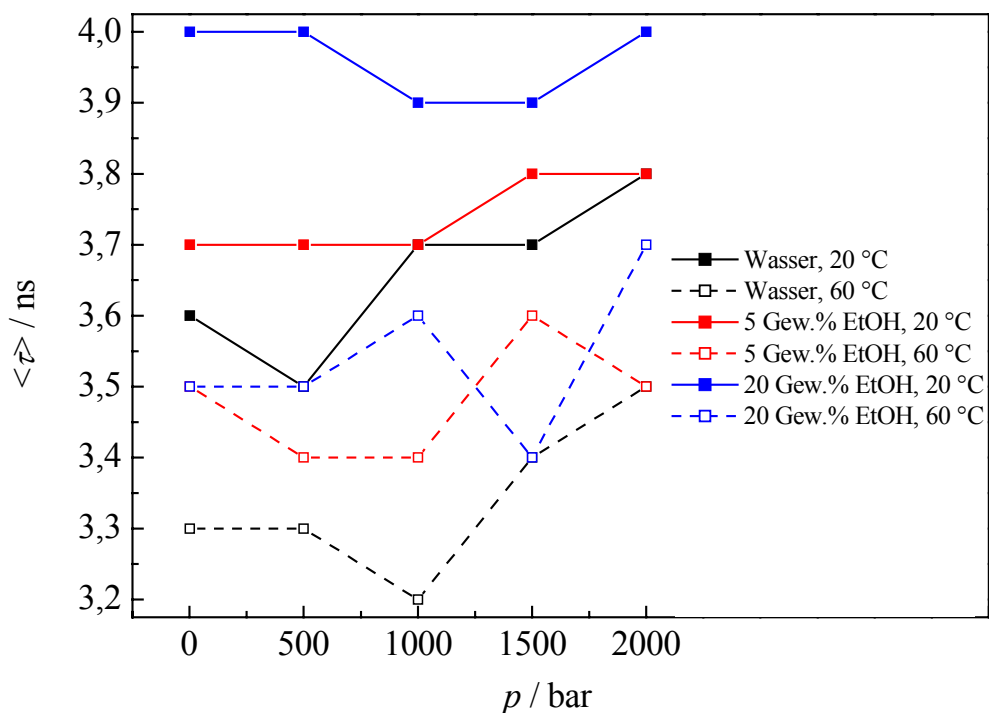


Abbildung 7.5: Darstellung der Druckabhängigkeit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von Alexa 488-markiertem Insulin in 0,1 M NaCl bei pH 1,9 in verschiedenen Lösungsmittelsystemen bei 20 °C und zu Beginn der Aggregation bei 60 °C. Die Ergebnisse basieren auf einer Analyse zeitaufgelöst gemessenen Fluoreszenzdaten (Phasenverschiebung und Demodulationsgrad) mit der *Globals Unlimited*-Software unter der Annahme eines biexponentiellen Modells zur Beschreibung des Abklingverhaltens der Fluoreszenz.

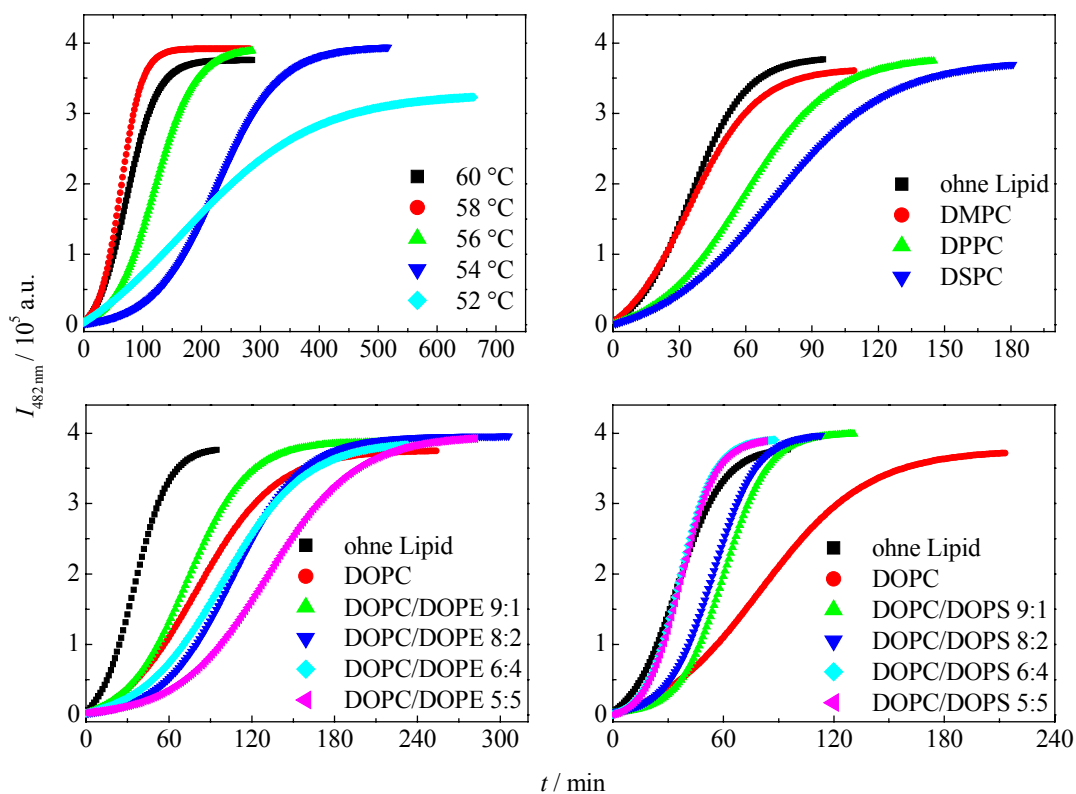


Abbildung 7.6: Repräsentative zeitabhängige ThT-Emissionsverläufe für die Aggregation von 0,05 Gew.% Insulin in Gegenwart von Lipidvesikeln verschiedener Zusammensetzungen bei 10-fachem molarem Lipidüberschuss, jeweils in 10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,1 M NaCl. Oben links: Einfluss des gel-fluid-Phasenüberganges von DSPC; oben rechts: Einfluss der Kettenlänge ungesättigter Lipide bei 60 °C; unten links: Einfluss des DOPE-Anteils in gemischten DOPC / DOPE-Vesikeln bei 60 °C; unten rechts: Einfluss des DOPS-Anteils in gemischten DOPC / DOPS-Vesikeln bei 60 °C. Proteinlösungen ohne Lipidvesikel, aber ansonsten gleichen Bedingungen, wurden zu Kontrollmessungen eingesetzt.

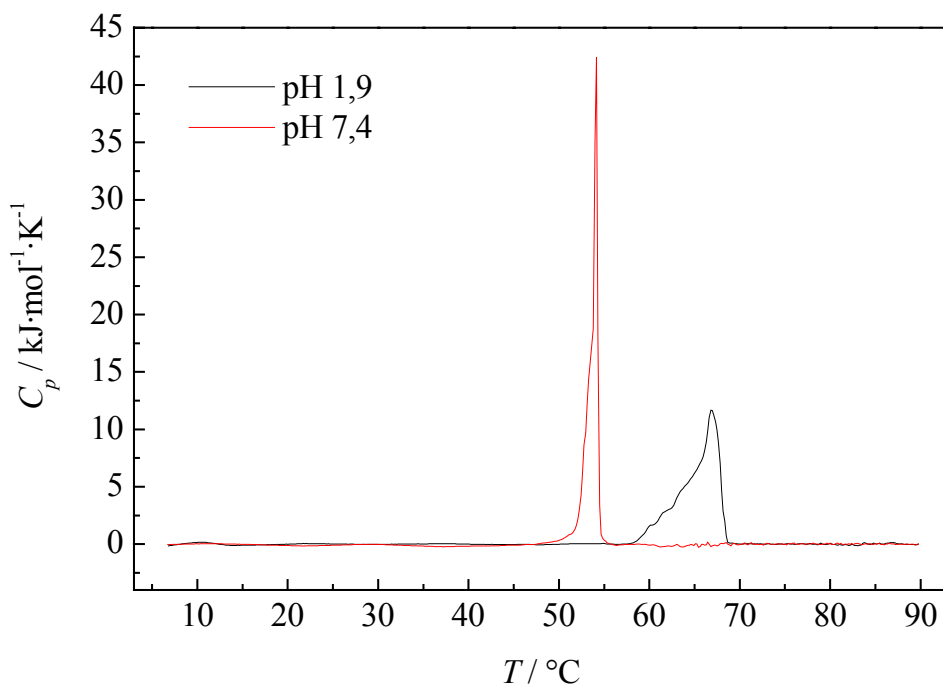


Abbildung 7.7: Basislinienkorrigierte, konzentrationsnormierte DSC-Thermogramme für multilamellare DSPC-Vesikel bei einer Lipidkonzentration von 8,63 mM und 0,1 M NaCl in Wasser / HCl, pH 1,9 bzw. 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4. Die Thermogramme wurden mit freundlicher Unterstützung von Lally Mitra im Arbeitskreis von Prof. Winter am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Dortmund aufgenommen.

8 Literatur

- [Abaszade 1971] Abaszade, A., Agaev, N. A. & Kerimov, A. M. (1971). *Russ. J. Phys. Chem.* **45**, 1517.
- [Adams 1969] Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J, Dodson, J. J., Vijayan, M. & Baker, E. N. (1969). *Nature*, **224**, 491-495.
- [Ahmad 2003] Ahmad, A., Millet, I. S., Doniach, S., Uversky, V. N. & Fink, A. L. (2003). *Biochemistry*, **42**, 11404-11416.
- [Ahmad 2004] Ahmad, A., Millet, I. S., Doniach, S., Uversky, V. N. & Fink, A. L. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 1499-15013.
- [Alcala 1987] Alcala, J. R. (1987). *Dissertation*, University of Illinois at Urbana/Champaign.
- [Ambrose 1951] Ambrose, E. J. & Elliott, A. (1951). *Prog. R. Soc. (London)*, **208**, 75-90.
- [Andrade 1985] Andrade, J. D. Principles of protein adsorption. In *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers. Vol. 2: Protein adsorption* (Andrade, J. D., ed), Plenum Press, New York, **1985**.
- [Anfinsen 1973] Anfinsen, C. B. (1973). *Science*, **181**, 223-230.
- [Arora 2004] Arora, A., Ha, C. & Park, C. B. (2004). *Protein Sci.* **13**, 2429-2436.
- [Atkins 1998] Atkins, P. W. *Physikalische Chemie*. VCH-Verlag, 2. Auflage, Weinheim, **1998**.
- [Balny 1997] Balny, C., Mozhaev, V., V. & Lange, R. (1997). *Comp. Biochem. Physiol.* **116A**, 299-304.
- [Balny 2002] Balny, C. (2002). *High Pressure Res.* **22**, 737-741.
- [Banting 1922] Banting, F.G. & Best, C. H. (1922). *J. Lab. Clin. Med.* **7**, 464-472.
- [Blundell 1972] Blundell, T., Dodson, G., Hodkin, D. & Mercola, D. (1972). *Adv. Protein Chem.* **26**, 279-402.

- [Boonyaratanakornkit 2002] Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B. & Clark, D. S. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 235-249.
- [Booth 1997] Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. F. & Pepys, M. B. (1997). *Nature*, **385**, 787-793.
- [Bouchard 2000] Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M. & Robinson, C. V. (2000). *Protein Sci.* **9**, 1969-1976.
- [Brahms 1980] Brahms, S. & Brahms, J. (1980). *J. Mol. Biol.* **138**, 149-178.
- [Brange 1987] Brange, J., Skelbaek-Pedersen, B., Langkjaer, L., Damgaard, U., Ege, H., Havelund, S., Heding, L. G., Jorgensen, K. H., Lykkeberg, J., Markussen, J., Pingel, M. & Rasmussen, E. *Galenics of insulin. The physicochemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations*. Springer-Verlag, Berlin, **1987**.
- [Brems 1990] Brems, D. N., Brown, P. L., Heckenlaible, L. A. & Frank, B. H. (1990). *Biochemistry*, **29**, 9289-9293.
- [Brinkley 1992] Brinkley, M. (1992). *Bioconjugate Chem.* **3**, 2-13.
- [Bucciantini 2002] Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J. S., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. & Stefani, M. (2002). *Nature*, **416**, 507-511.
- [Bucciantini 2004] Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C. M. & Stefani, M. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 31374-31382.
- [Bull 1978] Bull, H. B. & Breese, K. (1978). *Biopolymers*, **17**, 2121-2131.
- [Burke 1972] Burke, M. J. & Rougvie, M. A. (1972). *Biochemistry*, **11**, 2435-2439.
- [Cantor 1999] Cantor, R. S. (1999). *Biophys. J.* **76**, 2625-2639.

- [Cardamone 1992] Cardamone, M. & Puri, N. K. (1992). *Biochem. J.* **282**, 589-593.
- [Carrotta 2001] Carrotta, R., Bauer, R., Wanninge, R. & Rischel, C. (2001). *Protein Sci.* **10**, 1312-1318.
- [Caughey 2003] Caughey, B. & Lansbury, Jr., P. T. (2003). *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267-298.
- [Chan 1998] Chan, H. S. & Dill, K. A. (1998). *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **30**, 2-33.
- [Chi 2003] Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W. & Carpenter, J. F. (2003). *Pharm. Res.* **20**, 1325-1336.
- [Chiti 1999] Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., Dobson, C. M. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3590-3594.
- [Cinelli 1997] Cinelli, S., Onori, G. & Santucci, A. (1997). *J. Phys. Chem. B*, **101**, 8029-8043.
- [Cunningham 1955] Cunningham, L. W., Fischer, R. L. & Vestling, C. S. (1955). *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5703-5707.
- [Derewenda 1989] Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E., Dodson, G. G., Reynolds, C. D., Smith, G. D., Sparks, C. & Swenson, D. (1989). *Nature*, **338**, 594-596.
- [Dinner 2000] Dinner, A. R., Sali, A., Smith, L. J., Dobson, C. M. & Karplus, M. (2000). *Trends Biochem. Sci.* **25**, 331-339.
- [Dirix 2002] Dirix, C., Meersman, F., Smeller, L. & Heremans, K. (2002). *High Pressure Res.* **22**, 733-736.
- [Dirix 2003a] Dirix, C., Meersman, F. & Heremans, K. (2003). *High Pressure Res.* **23**, 63-66.
- [Dirix 2003b] Dirix, C., Esters, I., Meersman, F. & Heremans, K. in *Advances in high pressure bioscience and biotechnology II* (Winter, R., ed), Springer-Verlag, Berlin, **2003**.
- [Dirix 2005] Dirix, C., Meersman, F., MacPhee, C. E., Dobson, C. M. & Heremans, K. (2005). *J. Mol. Biol.* **347**, 903-909.

- [Dische 1988] Dische, F. E., Wernstedt, C., Westermark, G. T., Westermark, P., Pepys, M. B., Rennie, J. A., Gilbey, S. G. & Watkins, P. J. (1988). *Diabetologia*, **31**, 158-161.
- [Dobson 1999a] Dobson, C. M. (1999). *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329-332.
- [Dobson 1999b] Dobson, C. M & Karplus, M. (1999). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 92-101.
- [Dobson 2001] Dobson, C. M. (2001). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **356**, 133-145.
- [Dong 2003] Dong, J., Wan, Z., Popov, M., Carey, P. R. & Weiss, M. A. (2003). *J. Mol. Biol.* **330**, 431-442.
- [Dzwolak 2004a] Dzwolak, W. (2004). *High Pressure Res.* **24**, 511-516.
- [Dzwolak 2004b] Dzwolak, W., Smirnovas, V., Jansen, R. & Winter, R. (2004). *Protein Sci.* **13**, 1927-1932.
- [Dzwolak 2004c] Dzwolak, W., Ravindra, R. & Winter, R. (2004). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 1938-1943.
- [Dzwolak 2005] Dzwolak, W., Grudzielanek, S., Smirnovas, V., Ravindra, R., Nicolini, C., Jansen, R., Lokszejn, A., Porowski, S. & Winter, R. (2005). *Biochemistry* **44**, 8948-8958.
- [Ellis 1999] Ellis, R. J. & Hartl, F. U. (1999). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 102-110.
- [Engelhard 1995] Engelhard, M. & Evans, P. A. (1995). *Protein Sci.* **4**, 1553-1562.
- [Esteve 1995] Esteve, X., Patil, K. R., Fernández, J. & Coronas, A. (1995). *J. Chem. Thermodyn.* **27**, 281-292.
- [Eurekah] www.eurekah.com/dbimages/futermanKinnune1.JPG.
- [Fändrich 2001] Fändrich, M., Fletcher, M. A. & Dobson, C. M. (2001). *Nature*, **410**, 165-166.
- [Fändrich 2002] Fändrich, M. & Dobson, C. M. (2002). *EMBO J.* **21**, 5682-5690.
- [Farias 1986] Farias, R. N., López Viñals, A. & Morero, R. D. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**, 15508-15512.

- [Fernández 2003] Fernández, A. & Berry, R. S. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2391-2396.
- [Ferrão-Gonzales 2000] Ferrão-Gonzales, A., D., Souto, S., O., Silva, J., L. & Foguel, D. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6445-6450.
- [Fink 1998] Fink, A. L. (1998). *Folding Des.* **3**, R9-R23.
- [Fioroni 2002] Fioroni, M., Diaz, M. D., Burger, K. & Berger, S. (2002). *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7737-7744.
- [Foguel 1999] Foguel, D., Robinson, C. R., de Sousa, P. C., Jr., Silva, J. L. & Robinson, A. S. (1999). *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 552-558.
- [Friedhoff 1998] Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. (1998). *Biochemistry*, **37**, 10223-10230.
- [Frye 1998] Frye, K., J. & Royer, C., A. (1998). *Protein Sci.* **7**, 2217-2222.
- [Gellermann 2005] Gellermann, G. P., Appel, T. R., Tannert, A., Radestock, A., Hortschansky, P., Schroeckh, V., Leisner, C., Lütkepohl, T., Shtrasburg, S., Röcken, C., Pras, M., Linke, R. P., Diekmann, S. & Fändrich, M. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6297-6302.
- [Goldsbury 1997] Goldsbury, C. S., Cooper, G. J., Goldie, K. N., Muller, S. A., Saafi, E. L., Gruijters, W. T., Misur, M. P., Engel, A., Aebi, U. & Kistler, J. (1997). *J. Struct. Biol.* **119**, 17-27.
- [Goldsbury 2005] Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U. & Muller, S. A. (2005). *J. Mol. Biol.* **352**, 282-298.
- [Gorbenko 2006] Gorbenko, G. P. & Kinnunen, P. K. J. (2006). *Chem. Phys. Lipids*, **141**, 72-82.
- [Gorovits 1998] Gorovits, B. M. & Horowitz, P. M. (1998). *Biochemistry*, **37**, 6132-6135.
- [Greenfield 1996] Greenfield, N. J. (1996). *Anal. Biochem.* **235**, 1-10.
- [Greider 1969] Greider, M. H., Howell, S. L. & Lacy, P. E. (1969). *J. Cell. Biol.* **41**, 162-166.

- [Gross 1994] Gross, M. & Jaenicke, R. (1994). *Eur. J. Biochem.* **221**, 617-630.
- [Grudzielanek 2005] Grudzielanek, S., Jansen, R. & Winter, R. (2005). *J. Mol. Biol.* **351**, 879-894.
- [Grudzielanek 2006] Grudzielanek, S., Smirnovas, V. & Winter, R. (2006). *J. Mol. Biol.* **356**, 497-509.
- [Hansen 1986] Hansen, P. E., Brange, J. J. V. & Havelund, S. (1986). *United States Patent No. 4614730*.
- [Harper 1997] Harper, J. D. & Lansbury, P. T. (1997). *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 385-407.
- [Harroun 1999] Harroun, T. A., Heller, W. T., Weise, T. M., Yang, L. & Huang, H. W. (1999). *Biophys. J.* **76**, 937-945.
- [Hauner 2006] Hauner, H. (2006). *Der Diabetologe*, **2**, 38-43.
- [Hawley 1971] Hawley, S. A. (1971). *Biochemistry*, **10**, 2436-2442.
- [Hirnliga] <http://www.hirnliga.de/>
- [Hirota 1998] Hirota, N., Mizuno, K. & Goto, Y. (1998). *J. Mol. Biol.* **275**, 365-378.
- [Hong 1999] Hong, D.-P., Hoshino, M., Kuboi, R. & Goto, Y. (1999). *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8427-8433.
- [Hong 2006] Hong, D.-P., Ahmad, A & Fink, A. L. (2006). *Biochemistry*, **45**, 9342-9353.
- [Hua 2004] Hua, Q., & Weiss, M. A. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 21449-21460.
- [Hui 1997] Hui, W. E. in *Current topics in membranes. Vol. 44: Lipid polymorphism and membrane properties* (Epanand, R. M., Hrsg.), Academic Press, San Diego, **1997**.
- [Hummer 1998] Hummer, G., Garde, S., Garcia, A. E., Paulaitis, M. E. & Pratt, L. R. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1552-1555.
- [Jansen 2004] Jansen, R., Grudzielanek, S., Dzwolak, W. & Winter, R. (2004). *J. Mol. Biol.* **338**, 203-206.
- [Jansen 2005] Jansen, R., Dzwolak, W. & Winter, R. (2005). *Biophys. J.* **88**, 1344-1353.

- [Jayasinghe 2005] Jayasinghe, A. S. & Langen, R. (2005). *Biochemistry*, **44**, 12113-12119.
- [Jeffrey 1966a] Jeffrey, P. D. & Coates, J. H. (1966). *Biochemistry*, **5**, 489-498.
- [Jeffrey 1966b] Jeffrey, P. D. & Coates, J. H. (1966). *Biochemistry*, **5**, 3820-3824.
- [Jensen 2004] Jensen, M. Ø. & Mouritsen. O. G. (2004). *Biochim. Biophys. Acta*, **1666**, 205-226.
- [Jiménez 2002] Jiménez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V. & Dobson, C. M. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9196-9201.
- [Kayed 2003] Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T.M., Milton, S. C. Cotman, C. W. & Glabe, C. G. (2003). *Science*, **300**, 486-489.
- [Kelényi 1967] Kelényi, G. (1967). *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 172-180.
- [Kelly 1998] Kelly, J. W. (1998). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 101-106.
- [Kelly 2000] Kelly, S. M. & Price, N. C. (2000). *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 349-384.
- [Kenig 2004] Kenig, M., Berbić, Kriještorac, A., Kroon-Žitko, L., Tušek, M., Pompe-Novak, M. & Žerovnik, E. (2004). *Protein Sci.* **13**, 63-70.
- [Kentsis 1998] Kentsis, A. & Sosnick, T. R. (1998). *Biochemistry*, **37**, 14613-14622.
- [Khurana 2005] Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R. & Singh, S. (2005). *J. Struct. Biol.* **151**, 229-238.
- [Knight 2004] Knight, J., D. & Miranker, A., D. (2004). *J. Mol. Biol.* **341**, 1175-1187.
- [Koyonova 1998] Koyonova, R. & Caffrey, M. (1998). *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 91-145.
- [Krebs 2005] Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C. & Donald, A. M. (2005). *J. Struct. Biol.* **149**, 30-37.

- [Lakowicz 1999] Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2nd ed., New York, **1999**.
- [Lasic 1993] Lasic, D. D. *Liposomes: From physics to applications*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, **1993**.
- [LeVine III 1993] LeVine III, H. (1993). *Protein Sci.* **2**, 404-410.
- [LeVine III 1995] LeVine III, H. (1995). *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **2**, 1-6.
- [Levinthal 1968] Levinthal, C. (1968). *J. Chem. Phys.* **65**, 44-45.
- [Lindgren 2005] Lindgren, M., Sörgjerd, K. & Hammarström, P. (2005). *Biophys. J.* **88**, 4200-4212.
- [Löffler 1998] Löffler, G., Petrides, P.E. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 6. Auflage, Berlin, **1998**.
- [Lu 1997] Lu, H., Buck, M., Radford, S. E. & Dobson, C. M. (1997). *J. Mol. Biol.* **265**, 112-117.
- [MacDonald 1991] MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K. & Hu, L. R. (1991). *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 297-303.
- [Marcotte] <http://courses.cm.utexas.edu/emarcotte/>
- [Matulis 1998] Matulis, D. & Lovrien, R. (1998). *Biophys. J.* **74**, 422-429.
- [Moelbert 2004] Moelbert, S., Normand, B. & De Los Rios, P. (2004). *Biophys. Chem.* **112**, 45-57.
- [Molecular Probes 2001] *Alexa Fluor[®] 488 Protein Labeling Kit*, Manual, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, **2001**.
- [Molecular Probes] <http://www.probes.com/>
- [Naiki 1989] Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. & Takeda, T. (1989). *Anal. Biochem.* **177**, 244-249.
- [Nettleton 2000] Nettleton, E. J., Tito, P., Sunde, M., Bouchard, M., Dobson, C. M. & Robinson, C. V. (2000) *Biophys. J.* **79**, 1053-1065.

- [Nielsen 2001a] Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V. N. & Fink, A. L. (2001). *Biochemistry*, **40**, 6036-6046.
- [Nielsen 2001b] Nielsen, L., Frokjaer, S., Carpenter, J. F. & Brange, J. (2001). *J. Pharm. Sci.* **90**, 29-37.
- [Nuscher 2004] Nuscher, B., Kamp, F., Mehnert, T., Odoy, S., Haass, C., Kahle, P. J. & Beyer, K. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 21966-21975.
- [Nystrom 1999] Nystrom, F. H. & Quon, M. J. (1999). *Cell. Signal.* **11**, 563-574.
- [Omodeo-Sale 1987] Omodeo-Sale, F., Vecchio, G., Viani, P., Cervato, G. & Cestraro, B. (1987). *Cell. Mol. Biol.* **33**, 435-444.
- [Ottensmeyer 2000] Ottensmeyer, F. P., Beniac, D. R., Luo, R. Z.-T. & Yip, C. C. (2000). *Biochemistry*, **39**, 12103-12112.
- [Paladini 1981a] Paladini, A. A. & Weber, G. (1981). *Biochemistry*, **20**, 2587-2593.
- [Paladini 1981b] Paladini, A. A. & Weber, G. (1981). *Rev. Sci. Instrum.* **52**, 419-427.
- [Panchuk-Voloshina 1999] Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Steward, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W.-Y., Haugland, R. P. (1999). *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179-1188.
- [Pande 1998] Pande, V. S., Grosberg, A. Y., Tanaka, T. & Rokhsar, D. S. (1998). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 1-12.
- [PDB] <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [Pedersen 1999] Pedersen, T. B., Frokjaer, S., Mouritsen, O. G. & Jørgensen, K. (1999). *J. Liposome Res.* **9**, 261-274.
- [Perczel 1991] Perczel, A., Hollósi, M., Tusnády, G. & Fasman, G. D. (1991). *Protein Engin.* **4**, 669-679.
- [Perczel 1992] Perczel, A., Park, K. & Fasman, G. D. (1992). *Anal. Biochem.* **202**, 83-93.
- [POVRAY] <http://www.povray.org/>

- [Prevelige 1994] Prevelige, Jr., P. E., King, J. & Silva, J. L., *Biophys. J.* **66**, 1631- 1641.
- [Ptitsyn 1995] Ptitsyn, O. B. (1995). *Adv. Protein Chem.* **47**, 83-229.
- [Qu 1998] Qu, Y., Bolen, C. L. & Bolen, D. W. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9268-9273.
- [Ravindra 2003] Ravindra, R. & Winter, R. (2003). *Z. Phys. Chem.* **217**, 1221-1243.
- [Reed 1997] Reed, J. & Reed, A. (1997). *Anal. Biochem.* **254**, 36-40.
- [Rendell 1987] Rendell, D. *Fluorescence and Phosphorescence*. John Wiley & Sons, New York, **1987**.
- [Royer 2002] Royer, C.A. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 201-209.
- [Rusinova 2002] Rusinova, E., Tretyachenko-Ladokhina, V., Vele, O. E., Senear, D. F. & Ross, J. B. A. (2002). *Anal. Biochem.* **308**, 18-25.
- [Sanger 1953] Sanger, F. & Thompson, E. O. P. (1953). *Biochem. J.* **53**, 366-374.
- [Sasisanker 2004] Sasisanker, P., Oleinikova, A., Weingärtner, H., Ravindra, R. & Winter, R. (2004). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 1899-1905.
- [Scheffler 1981] Scheffler, K., Straub, J. & Grigull, K. *Wasserdampfatafeln*. Springer-Verlag, Berlin, **1981**.
- [Schwinke 1983] Schwinke, D. L., Ganesan, M. G. & Weiner, N. D. (1983). *J. Pharm. Sci.* **72**, 244-248.
- [Selkoe 2003] Selkoe, D. J. (2003). *Nature*, **426**, 900-904.
- [Semisotnov 1991] Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F. & Gilmanshin, V. N. (1991). *Biopolymers*, **31**, 119-128.
- [Serio 1999] Serio, T. R., Cashikar, A. G., Moslehi, J. J., Kowal, A. S. & Lindquist, S. L. (1999). *Meth. Enzymol.* **309**, 649-673.
- [Sharp 2002] Sharp, J. S., Forrest, J. A. & Jones, R. A. L. (2002). *Biochemistry*, **41**, 15810-15819.

- [Silva 1993] Silva, J. L. & Weber, G. (1993). *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 89-113.
- [Singer 1972] Singer, S. J. & Nicholson, G. L. (1972). *Science*, **175**, 720-731.
- [Sipe 2000] Sipe, J. D. & Cohen, A. S. (2000). *J. Struct. Biol.* **130**, 88-98.
- [Slavik 1982] Slavik, J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 1-25.
- [Sluzky 1991] Sluzky, V., Tamada, J. A., Klibanov, A. M. & Langer, R. (1991). *PNAS*, **88**, 9377-9381.
- [Sluzky 1992] Sluzky, V., Klibanov, A. M. & Langer, R. (1992). *Biotech. Bioeng.* **40**, 895-903.
- [Smeller 1999] Smeller, L., Rubens, P. & Heremans, K. (1999). *Biochemistry*, **38**, 3816-3820.
- [Smeller 2002] Smeller, L. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 11-29.
- [Souillac 2002a] Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S. & Fink, A. L. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 12657-12665.
- [Souillac 2002b] Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S. & Fink, A. L. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 12666-12679.
- [Souillac 2003] Souillac, P. O., Uversky, V. N. & Fink, A. L. (2003). *Biochemistry*, **42**, 8094-8104.
- [St. John 1999] St. John, R. J., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13029-13033.
- [Stefani 2003] Stefani, M. & Dobson, C. M. (2003). *J. Mol. Med.* **81**, 678-699.
- [Störkel 1983] Störkel, S., Schneider, H. M., Müntefering, H. & Kashiwagi, S. (1983). *Lab. Invest.* **48**, 108-111.
- [Strazza 1985] Strazza, S., Hunter, R., Walker, E. & Darnall, D. W. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 30-42.
- [Strickland 1976] Strickland, E. H. & Mercola, D. (1976). *Biochemistry*, **15**, 3875-3884.

- [Stubbs 1996] Stubbs, C. D. & Slater, S. J. (1996). *Chem. Phys. Lipids*, **81**, 185-195.
- [Sunde 1997] Sunde, M. & Blake, C. C. F. (1997). *Adv. Protein Chem.* **50**, 123-159.
- [Sunde 1998] Sunde, M. and Blake, C. C. F. (1998). *Quarterly Rev. Biophys.* **31**, 1-39.
- [Swift 2002] Swift, B., Hawkins, P. N., Richards, C. & Gregory, R. (2002). *Diabetic Med.* **19**, 881-886.
- [Thirumalai 2003] Thirumalai, D., Klimov, D. K. & Dima, R. I. (2003). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 146-159.
- [Thomas 1993] Thomas, P. D. & Dill, K. A. (1993). *Protein Sci.* **2**, 2050-2065.
- [Timasheff 1993] Timasheff, S. N. (1993). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 67-97.
- [Timasheff 1998] Timasheff, S. N. (1998). *Adv. Protein Chem.* **51**, 355-432.
- [Timasheff 2002] Timasheff, S. N. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9721-9726.
- [Uversky 2003] Uversky, V. N., Nielsen Garriques, L., Millett, I. S., Frokjaer, S., Brange, J., Doniach, S. & Fink, A. L. (2003). *J. Pharm. Sci.* **92**, 847-858.
- [Uversky 2004] Uversky, V. N. & Fink, A. L. (2004). *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 131-153.
- [Vassar 1959] Vassar, P. S. & Culling, C. F. A. (1959). *Arch. Pathol.* **68**, 487-494.
- [Vogelpohl 1955] Vogelpohl, G. Viscosität. In *Landolt-Börnstein. Zahlenwerke und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik. Band IV, Teil 1: Technik* (Bartels, J., Tenbruggencate, P., Hellwege, K. H., Schäfer, K. & Schmidt, E., Hrsg.), Springer-Verlag, 6. Auflage, Berlin, **1955**.
- [Voropai 2003] Voropai, E. S., Samtsov, M. P., Kaplevskii, K. N., Maskevich, A. A., Stepuro, V. I., Povarova, O. I.,

- Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., Fink, A. L. & Uverskii, V. N. (2003). *J. Appl. Spectrosc.* **70**, 868-874.
- [Walgers 1998] Walgers, R., Lee, T. C. & Cammers-Goodwin, A. (1998). *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5073-5079.
- [Waugh 1946] Waugh, D. F. (1946). *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 247-250.
- [Weber 1953] Weber, G. (1953). *Adv. Protein Chem.* **8**, 415-495.
- [Weil 1965] Weil, L., Seibles, T. S. & Herskovits, T. T. (1965). *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 308-320.
- [Whittingham 2002] Whittingham, J. L., Scott, D. J., Chance, K., Wilson, A., Finch, J., Brange, J. & Dodson, G. G. (2002). *J. Mol. Biol.* **318**, 479-490.
- [Winter 1998] Winter, R. & Noll, F. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner-Verlag, Stuttgart, **1998**..
- [Yang 1999] Yang, D. S., Yip, C. M., Huang, T. H. J., Chakrabartty, A. & Fraser, P. E. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 32970-32974.
- [Yusa 1977] Yusa, M., Mathur, G. P. & Stager, R. A. (1977). *J. Chem. Engin. Data* **22**, 32-35.
- [Zhang 2002] Zhang, Y., Whittingham, J. L., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Brange, J. & Dodson, G. G. (2002). *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **58**, 186-187.
- [Zhao 2004] Zhao, H., Tuominen, E. K. J. & Kinnunen, P. K. J. (2004). *Biochemistry*, **43**, 10302-10307.
- [Zhu 2003] Zhu, M., Li, J. & Fink, A. L. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 40186-40197.
- [Zidovetzki 1997] Zidovetzki, R. in *Current topics in membranes. Vol. 44: Lipid polymorphism and membrane properties* (Erand, R. M., Hrsg.), Academic Press, San Diego, **1997**.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Grudzielanek
Geburtsdatum: 18.09.1978
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1985 - 1989 Städtische Gemeinschafts-Grundschule in Lünen-Horstmar
1989 - 1998 Gymnasium in Lünen-Altünen

Studium

WS 1998/99 - SS 2004 Studium der Chemie an der Universität Dortmund
07/2004 Studienabschluss als Dipl.-Chem.
Thema der Diplomarbeit: „Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Aggregation von Insulin“
09/2004 - z. Z. Promotion am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Dortmund bei Prof. Dr. R. Winter

Berufstätigkeit

01/2004 - z. Z. wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Dortmund