

Charakterisierung der Wechselwirkung von Proteinen mit Modellbiomembranen unter Verwendung der ATR-FTIR- Spektroskopie

DISSERTATION

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

eingereicht bei der Fakultät Chemie
der Technischen Universität Dortmund

von
Dipl.-Chem. Daniel Sellin
aus Münster

Dortmund
2010

--- Zusammenfassung der Arbeit ---

Zusammenfassung

Die Neigung von hIAPP und dessen Propeptid proIAPP, durch Ausbildung intermolekularer β -Faltblätter Aggregate zu bilden, wird durch deren Wechselwirkung mit Lipidmembranen beeinflusst. Die Amyloidogenese des hIAPP, Ursache von Diabetes Mellitus Typ 2, kann durch zwei Klassen von Inhibitoren verhindert werden. Molekülinhibitoren sind kleine organische Moleküle, meist zu der Klasse der Polyphenole gehörend. Peptidinhibitoren sind Aminosäuresequenzen, die chemisch modifiziert sein können.

Die Einflüsse von Lipidmembranen auf die Amyloidogenese von hIAPP und proIAPP und die damit verbundenen Sekundärstrukturänderungen wurden unter Verwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie in Gegenwart von homogenen neutralen und anionischen sowie heterogenen Modellmembranen untersucht. Dazu wurden zunächst die Sekundärstrukturen von nativem hIAPP und proIAPP in Abwesenheit von Lipiden verglichen. Der Befund, dass beide Peptide in Lösung fast die gleiche Sekundärstrukturzusammensetzung einnehmen, deckt sich mit Ergebnissen aus der CD-Spektroskopie. ProIAPP enthält geringfügig mehr α -Helices, während hIAPP etwas mehr Schleifen und Zufallsknäuel aufweist. Wird 10 μM hIAPP bei 25 $^{\circ}\text{C}$ in die ATR-Zelle injiziert (in Abwesenheit von Lipiden), so aggregiert das Molekül nach einer kurzen Nukleationsphase (~ 25 min) unter Ausbildung intermolekularer β -Faltblätter, während der Anteil an α -Helices, ungeordneten Strukturen und Schleifen zurückgeht. Bei Anwesenheit von homogenen, neutralen Lipidmembranen (DOPC) bleibt die Aggregation des hIAPP-Moleküls aus. Es findet lediglich eine geringfügige Aggregation statt, die zum Stillstand kommt, bevor sich reife Fibrillen bilden. Die Gegenwart von homogenen anionischen und heterogenen Raftmembranen beschleunigt hingegen die Aggregation und Fibrillbildung, wobei der Effekt der anionischen Membran am drastischsten ist. Ein äquimolarer Gehalt an proIAPP in der hIAPP-Lösung verzögert die Aggregation in Gegenwart von anionischen Lipidmembranen nur geringfügig.

ProIAPP ist ein weitaus schwächeres Amyloidogen als hIAPP. Für eine vollständige Aggregation in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran braucht es 40 μM proIAPP und die Aggregation dauert 7 Tage. In Gegenwart einer Raftmembran ist die Aggregation von 40 μM proIAPP unvollständig und in Gegenwart einer DOPC-Membran erfolgt sie gar nicht. Die Aggregation in Gegenwart der anionischen Membran verläuft nach einem ähnlichen Mechanismus wie die von hIAPP, jedoch in einem viel längeren Zeitrahmen.

Die auf einem Rhodaningerüst basierenden Molekülinhibitoren **1** und **2** (Struktur siehe Bild 2.6) sowie die Verbindungen Resveratrol, Chicago Sky Blue und Lacmoid wurden auf deren Fähigkeit hin getestet, die hIAPP-Aggregation in Gegenwart von anionischen Lipidmembranen zu unterdrücken. Verbindung **1** verhindert die Aggregation durch Stabilisierung der Monomere, während Verbindung **2** die Bildung kleiner Oligomere begünstigt. Bei Resveratrol wird die Fibrillbildung ebenfalls in einem frühen Stadium, jedoch

geringfügig später unterbrochen als bei den Rhodaninderivaten. Die Verbindungen Chicago Sky Blue und Lacmoid wurden positiv als Inhibitoren der hIAPP-Fibrillbildung getestet.

Die Bindungsaffinität der Peptidinhibitoren IAPP-GI, NFGAIL-GI, des natürlichen hIAPP-Aggregationsinhibitors Insulin, des natürlichen, nichtamyloidogenen hIAPP-Analogons rIAPP sowie des hIAPP-analogen Hexapeptids NFGAIL zur anionischen Membran und die Sekundärstruktur im Falle von Membranbindung wurden ATR-FTIR-spektroskopisch bestimmt. Während IAPP-GI, Insulin und rIAPP an die anionische Lipidmembran binden, verbleiben NFGAIL-GI und NFGAIL aufgrund des fehlenden positiv geladenen N-Terminus in Lösung und weisen daher keine ATR-Spektren auf. Die Sekundärstrukturzusammensetzung von membrangebundenem rIAPP wurde anhand der Amid-I'-Bande zu 28 % Kehren und Schleifen, 13 % α -Helices, 43 % intramolekularen β -Faltblättern und 16 % ungeordneten Konformationen bestimmt und stimmt mit der von rIAPP in Lösung überein. Die Sekundärstrukturzusammensetzung von membrangebundenem IAPP-GI wurde zu ~31 % Kehren und Schleifen, 14 % α -Helices, 40 % β -Faltblättern und 16 % ungeordneten Konformationen bestimmt. Die inhibierenden Eigenschaften von IAPP-GI, NFGAIL-GI, Insulin und rIAPP auf die Aggregation von hIAPP in Gegenwart von anionischen Lipidmembranen wurden durch Inkubation einer 1:1-Mischung einer jeden Komponente mit hIAPP in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran bestimmt. Jeder dieser Inhibitoren verhindert die Aggregation und Fibrillbildung von hIAPP durch Verhinderung der Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken. NFGAIL-GI vermindert außerdem die Wechselwirkung von hIAPP mit der Lipidmembran, was einen zusätzlichen inhibierenden Effekt mit sich bringt. Durch Zugabe von IAPP-GI oder NFGAIL-GI zu zuvor an der anionischen Membran geformten hIAPP-Fibrillen wurde untersucht, ob diese Peptidinhibitoren in der Lage sind, Fibrillen wieder aufzulösen, welche in die Membran eingebettet sind. Es zeigte sich, dass beide Inhibitoren auch im zehnfachen molaren Überschuss die Aggregation nicht revidieren. Die Fähigkeit von IAPP-GI, aggregiertes hIAPP in wässriger Phase wieder aufzulösen, geht also in Gegenwart von Lipidmembranen verloren. Im Falle von NFGAIL-GI besteht, wie zu erwarten, weder die Fähigkeit, Fibrillen in wässriger Phase aufzulösen, noch geht es eine Wechselwirkung mit der Membran ein. Im Falle von IAPP-GI ist die Immobilisierung des Moleküls in der Lipidmatrix eine mögliche Ursache für den Verlust der fibrillauflösenden Aktivität. Die starre Einbettung des hIAPP in die Lipidmembran könnte eine weitere Ursache sein, da die Wechselwirkung von hIAPP und IAPP-GI dadurch erschwert wird.

Die kleine GTPase Ras spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion. Bei der lipidmodifizierten Form von N-Ras Far/HD (Farnesyl- und Hexadecyl-Lipidanker) wurde kürzlich in einer Studie beobachtet, dass sich das Molekül in Gegenwart von heterogenen Raftmembranen an den Phasengrenzen der flüssig-ungeordneten/flüssig-geordneten Lipiddomänen akkumuliert. Unter Verwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie wurde die Adsorptionskinetik und die Sekundärstruktur von N-Ras Far/HD in Gegenwart der Raft-

Membran bestimmt. Da die Diffusions-geschwindigkeit des N-Ras-Moleküls in Lösung in einer anderen Größenordnung liegt, als die Adsorptionskinetik, kann daraus gefolgert werden, dass die Adsorptionskinetik durch relativ langsame Einbauprozesse des N-Ras-Moleküls in die heterogene Membran bestimmt wird. Die Sekundärstrukturzusammensetzung von N-Ras Far/HD in Gegenwart der Raftmembran, ermittelt durch Bandenanpassung der Amid-I'-Bande, beträgt ~14 % Schleifen, 25 % α -Helices, 15 % ungeordnete Strukturen und 46 % β -Strukturen. Eine Sekundärstrukturänderung des N-Ras Far/HD während der Adsorption an die trägergebundene Raftmembran wird vermutlich durch die Oberflächen-beschaffenheit des Ge-Trägers im Mikro- bis Nanometerbereich beeinflusst. Im Falle der Sekundärstrukturänderung wurde eine Zunahme von intermolekularen β -Faltblättern auf Kosten von intramolekularen β -Faltblättern und ungeordneten Strukturen festgestellt, während sich die α -Helices und Schleifenstrukturen nicht signifikant änderten.