

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinz Rehage

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2010

Für Lisa Mara und Leah Zuri

Inhaltsverzeichnis

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....	IV
PUBLIKATIONEN	VI
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHER HINTERGRUND.....	7
2.1 PROTEINFALTUNG	7
2.2 AMYLOIDE.....	10
2.3 MEMBRANEN.....	14
2.3.1 <i>Einfluss von Membranen auf amyloidogene Proteine.....</i>	<i>16</i>
2.3.2 <i>Verteilung von Ras in Membranen.....</i>	<i>17</i>
2.4 hIAPP UND DIABETES MELLITUS TYP 2.....	19
2.5 PROIAPP	24
2.6 INHIBITOREN DER AGGREGATION VON hIAPP	26
2.6.1 <i>Molekülinhibitoren.....</i>	<i>26</i>
2.6.2 <i>Peptidinhibitoren</i>	<i>28</i>
2.7 N-RAS	30
2.8 ATR-FTIR-SPEKTROSKOPIE VON MEMBRAN-PROTEIN-SYSTEMEN.....	35
3 EXPERIMENTELLES.....	47
3.1 SPEKTROMETER UND ATR-ZUBEHÖR.....	47
3.2 CHEMIKALIEN.....	48
3.2.1 <i>Verwendete Puffersysteme</i>	<i>50</i>
3.3 VESIKEL- UND MEMBRANPRÄPARATION	51
3.3.1 <i>Lipidmischungen.....</i>	<i>51</i>
3.3.2 <i>Präparation multilamellarer Vesikel (MLV).....</i>	<i>51</i>
3.3.3 <i>Präparation großer, unilamellarer Vesikel.....</i>	<i>52</i>
3.3.4 <i>Präparation trägergestützter Membranen</i>	<i>52</i>
3.4 PROBENVORBEREITUNG	53
3.5 DURCHFÜHRUNG DER MESSUNGEN	54
3.5.1 <i>hIAPP- und proIAPP-Experimente.....</i>	<i>55</i>

3.5.2	<i>hIAPP-Inhibitor-Experimente</i>	56
3.5.3	<i>N-Ras an einer trägergestützten DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raftmembran</i>	57
3.6	AUSWERTUNG.....	58
3.6.1	<i>Software</i>	58
3.6.2	<i>Auswertung der Spektren der Lipidmembran</i>	58
3.6.3	<i>Auswertung der Amid-I'-Bande des Peptids/Proteins</i>	58
3.6.4	<i>Sekundärstrukturanalyse</i>	59
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	61
4.1	SEKUNDÄRSTRUKTUR VON hIAPP UND proIAPP	61
4.2	AGGREGATION VON hIAPP AN MEMBRANEN.....	64
4.2.1	<i>hIAPP in Abwesenheit einer Lipidmembran</i>	64
4.2.2	<i>hIAPP in Gegenwart einer DOPC Doppelschicht</i>	67
4.2.3	<i>hIAPP in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran</i>	69
4.2.4	<i>hIAPP in Gegenwart einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) „Raft“ Modellmembran</i>	73
4.2.5	<i>Einfluss von proIAPP auf die Aggregation von hIAPP</i>	76
4.3	AGGREGATION VON proIAPP	80
4.3.1	<i>proIAPP in Gegenwart einer homogenen DOPC- und einer heterogenen DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raftmembran</i>	80
4.3.2	<i>proIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Lipidmembran</i>	82
4.4	INHIBITION DER hIAPP-AGGREGATION DURCH MOLEKÜLINHIBITOREN	86
4.4.1	<i>Rhodanininhibitoren</i>	86
4.4.2	<i>Resveratrol</i>	88
4.5	INHIBITION DER hIAPP-AGGREGATION DURCH PEPTID-INHIBITOREN	91
4.5.1	<i>hIAPP-Analoga und Insulin in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran</i>	91
4.5.2	<i>hIAPP/Peptidinhibitor - Heterokomplexe</i>	93
4.5.3	<i>Einfluss von IAPP-GI und NFGAIL-GI auf an der Membran geformte hIAPP-Fibrillen</i> ..	95
4.6	SEKUNDÄRSTRUKTUR VON N-RAS FAR/HD IN GEGENWART VON RAFT-MEMBRANEN.....	98
4.6.1	<i>Adsorption von N-Ras Far/HD an eine heterogene DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raft-Membran ohne Änderung der Sekundärstruktur</i>	99
4.6.2	<i>Sekundärstruktur von N-Ras Far/HD</i>	102
5	ZUSAMMENFASSUNG	107
6	ANHANG	111
6.1	EINFLUSS VON CHICAGO SKY BLUE UND LACMOID AUF DIE hIAPP-FIBRILLBILDUNG IN GEGENWART EINER ANIONISCHEN DOPC/DOPG (7:3) LIPIDMEMBRAN.....	111

6.2	VERGLEICH DER ATR-FTIR-SPEKTREN VON RIAPP IN AN- UND ABWESENHEIT EINER DOPC/DOPG (7:3) MEMBRAN	112
6.3	ZEITLICHE ÄNDERUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR VON N-RAS FAR/HD WÄHREND DER ADSORPTION AN EINE HETEROGENE DOPC/DPPC/CHOL (1:2:1) RAFT-MEMBRAN	113
7	LITERATURVERZEICHNIS	117

Verwendete Abkürzungen und Symbole

A β	<u>A</u> myloid <u>B</u> eta Peptide
AFM	<u>A</u> tomic <u>F</u> orce <u>M</u> icroscopy
ATR-FTIR	<u>A</u> ttenuated <u>T</u> otal <u>R</u> eflection <u>F</u> ourier <u>T</u> ransform <u>I</u> nfrared Spectroscopy
ATP	<u>A</u> denosin- <u>T</u> riphosphat
a.u.	<u>A</u> rbitrary <u>U</u> nits
CD	<u>C</u> ircular <u>D</u> ichroism
Chol	Cholesterol
CPE	<u>C</u> arboxypeptidase <u>E</u>
CR	<u>C</u> ongo <u>R</u> ed
DOPC	1,2- <u>d</u> ioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl <u>ch</u> olin
DOPG	1,2- <u>d</u> ioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phosphatidyl- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
DPPC	1,2- <u>d</u> ipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl <u>ch</u> olin
DTE	<u>D</u> ithio <u>e</u> rythritol
EGCG	(-)- <u>E</u> pigallo <u>c</u> atechin- <u>G</u> allat
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
Far	Farnesyl-
FSD	<u>F</u> ourier <u>S</u> elf <u>D</u> econvolution
GDP	<u>G</u> uanosin-5'- <u>d</u> iphosphat
GPI	<u>G</u> lycosyl- <u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
Grb2	<u>G</u> rowth-Factor- <u>R</u> eceptor- <u>B</u> ound Protein <u>2</u>
GTP	<u>G</u> uanosin-5'- <u>t</u> riphosphat

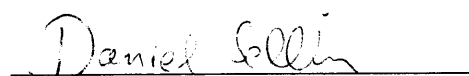
HD	<u>H</u> exad <u>e</u> cyl-
HFIP	<u>H</u> exa <u>f</u> luoro- <u>I</u> sopropanol
hIAPP	<u>H</u> uman <u>I</u> slet <u>A</u> myloid <u>P</u> olypeptide (Amylin)
HVR	<u>H</u> ypervariable <u>R</u> egion
IDE	<u>I</u> nsulin- <u>D</u> egrading <u>E</u> nzyme
IRE	<u>I</u> nternal <u>R</u> eflection <u>E</u> lement
LUV	<u>L</u> arge <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles
MIC	<u>M</u> aleimidocaproyl-
MLV	<u>M</u> ultilamellar <u>V</u> esicles
PAM	<u>P</u> eptidyl <u>A</u> midating <u>M</u> onooxygenase Complex
PC	<u>P</u> rohormone <u>C</u> onvertase
pH	pondus <u>H</u> ydrogenii
PI3-K	<u>P</u> hosphoinositid- <u>3</u> - <u>K</u> inase
PM	<u>P</u> lasma <u>m</u> embran
proIAPP	<u>P</u> roislet <u>A</u> myloid <u>P</u> olypeptide
rIAPP	<u>R</u> odent <u>I</u> slet <u>A</u> myloid <u>P</u> olypeptide
RTK	<u>R</u> ezeptor- <u>T</u> yrosin <u>k</u> inase
SDS	<u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SDSL	<u>S</u> ite- <u>D</u> irected <u>S</u> pin <u>L</u> abeling
SOS	<u>S</u> on of <u>S</u> evenless
TEM	<u>T</u> ransmissions- <u>E</u> lektronen <u>m</u> ikroskopie
ThT	<u>T</u> hioflavin <u>T</u>
TFE	<u>T</u> ri <u>f</u> luorethanol
T2DM	<u>T</u> yp <u>2</u> <u>D</u> iabetes <u>M</u> ellitus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Publikationen

- Mishra, R., Bulic, B., Sellin, D., Jha, S., Waldmann, H. & Winter, R. (2008). Small-molecule inhibitors of islet amyloid polypeptide fibril formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 4679-4682.
- Mishra, R., Sellin, D., Radovan, D., Gohlke, A. & Winter, R. (2009). Inhibiting Islet Amyloid Polypeptide Fibril Formation by the Red Wine Compound Resveratrol. *Chem. Bio. Chem.* **10**, 445-449.
- Jha, S., Sellin, D., Seidel, D. & Winter, R. (2009). Amyloidogenic Propensities and Conformational Properties of ProIAPP and IAPP in the Presence of Lipid Bilayer Membranes. *J. Mol. Biol.* **389**, 907-920.
- Evers, F., Jeworrek, C., Tiemeyer, S., Weise, K., Sellin, D., Paulus, M., Struth, B., Tolan, M. & Winter, R. (2009). Elucidating the Mechanism of Lipid Membrane-Induced IAPP Fibrillogenesis and Its Inhibition by the Red Wine Compound Resveratrol: A Synchrotron X-ray Reflectivity Study. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9516-9521.
- Sellin, D., Yan, L.-M., Kapurniotu, A. & Winter, R. (2009). Suppression of IAPP Fibrillation at Anionic Lipid Membranes via IAPP-derived Amyloid Inhibitors and Insulin. *Biophys. Chem.*, in press.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate kenntlich gemacht habe.

Dortmund, 21.01.2010


Daniel Sellin

1 Einleitung

In einer biologischen Zelle nehmen Proteine einen funktionellen gefalteten Zustand ein, gesteuert durch streng regulierte Prozesse. Die Dynamiken, Energien und Strukturen, welche die Faltung von Proteinen steuern, sind für deren biologische Funktion entscheidend. Zelluläre Systeme erhalten die Balance zwischen Proteinsynthese und deren Abbau unter anderem mithilfe von molekularen Chaperonen und dem Proteasom. Die Gewährleistung einer akkuraten Proteinfaltung ist für die Erhaltung der richtigen Funktion der Zelle äußerst wichtig. Die Qualitätskontrollmechanismen in der Zelle verhindern die Ablagerung von teilweise gefalteten, fehlgefalteten oder zersetzten Proteinen. Wenn die Balance zwischen der Proteinsynthese und dem Proteinabbau gestört ist, können sich Proteine als unvollständige oder fehlgefaltete Monomere oder Proteinfragmente bilden, oder auch durch intermolekulare Wechselwirkung Aggregate bilden. Ob und wie sich ein Protein faltet, wird primär durch dessen Aminosäuresequenz und das zelluläre Umfeld beeinflusst, das die Polypeptidkette umgibt. Die Proteinfaltung in der Zelle findet entweder im Zytoplasma oder auf dem sekretorischen Pfad statt. ATP-getriebene Chaperone im Zytoplasma und dem Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) arbeiten gemeinsam, um der Polypeptidkette die Möglichkeit zu geben, sich richtig zu falten. Misslingt die Faltung, wird das Polypeptid zum Proteasom – einem großen Proteasekomplex mit vielen Untereinheiten – dirigiert, um dort abgebaut zu werden.

Viele Krankheiten werden durch einen Verlust der Proteinfunktion verursacht, weil sich das Protein fehlfaltet und daher vom Proteasom abgebaut wird. Zystische Fibrose und α 1-Antitrypsin-Defizienz sind Krankheiten, welche unter diese Kategorie fallen. Die meisten Fehlfaltungskrankheiten werden jedoch durch Konformationsumwandlungen, die mit einer Aggregation der fehlgefalteten Proteine außerhalb der Zelle, also außerhalb des Einflusses der intrazellulären Qualitätskontrollen einhergehen, verursacht. Die Hauptvertreter dieser Krankheiten sind die Amyloidosen, bei denen die Proteinaggregation im extrazellulären Raum mit einer toxischen Wirkung verbunden ist.

Proteine, die den sekretorischen Pfad nutzen, um sich zu falten oder ausgeschleust zu werden, sind bei Proteinefehlfaltungskrankheiten überdurchschnittlich stark vertreten. Diese Proteine falten sich im ER und gelangen dann über den sekretorischen Pfad zu ihrem Ziel, wo die Bedingungen sehr unterschiedlich sein können. Zum Beispiel

müssen sich lysosomale Enzyme bei neutralem pH falten, um das ER zu verlassen. Jedoch sind deren Sequenzen für die Faltung und Stabilität bei pH 5 (lysosomaler pH) optimiert. Mutationen in den lysosomalen Proteinen können die Faltung im ER nachteilig beeinflussen, was zum Abbau durch die Qualitätskontrollmaschinerie führt. Erstaunlicherweise wären viele der Varianten, die erbliche lysosomale Speicherkrankheiten verursachen, in der Lage, sich im Lysosom in funktionierende Enzyme zu falten, wenn sie nur dorthin gelangen könnten. Im Gegensatz dazu scheinen sich amyloidogene Proteine effizient im ER zu falten, bekommen jedoch Probleme in ihrer Zielumgebung, wo sie sich fehlfalten und fälschlicherweise zusammenlagern (Amyloidogenese) [Cohen & Kelly, 2003].

Das hIAPP (human islet amyloid polypeptide, auch: Amylin) ist ein 37 Aminosäuren langes, pankreatisches Peptidhormon, welches von den β -Zellen zusammen mit Insulin sezerniert wird (siehe Abschnitt 2.4). Durch seine Neigung, sich intermolekular zusammenzulagern und in der extrazellulären Matrix des Pankreas unlösliche Plaques zu bilden, ist es ein Hauptverursacher der altersbedingten Diabetes Mellitus Typ 2 (T2DM). Das Vorläuferpeptid proIAPP wird im ER der β -Zellen synthetisiert und unterliegt auf dem sekretorischen Pfad einer Prozessierung in mehreren Schritten, bis es schließlich als reifes hIAPP in den extrazellulären Raum entlassen wird. Es gibt Hinweise, dass die in der Zelle allgegenwärtigen Lipidmembranen die Aggregation des hIAPP beschleunigen.

Ein möglicher Ansatz bei der Therapie von T2DM ist die Entwicklung von Medikamenten, sogenannten Inhibitoren, die die Aggregation des hIAPP verhindern, indem sie den nativen Zustand stabilisieren oder die Aggregation kinetisch hemmen. Dabei wird zwischen Molekülinhibitoren und Peptidinhibitoren unterschieden. Die Molekülinhibitoren sind kleine organische Moleküle, die im Allgemeinen der Gruppe der Polyphenole angehören. Peptidinhibitoren sind kurze Aminosäuresequenzen, die chemisch modifiziert sein können. In Bild 1.1 sind die Sequenzen der Peptide hIAPP und NFGAIL, sowie der durch N-Methylierung daraus abgeleiteten Peptidinhibitoren IAPP-GI und NFGAIL-GI aufgeführt. Die Strukturformeln der Molekülinhibitoren Resveratrol, sowie zweier Rhodaninderivate sind in Bild 2.6 (Abschnitt 2.6.1) dargestellt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Bindung von N-Ras Far/HD an eine DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) „Raft“ Modellmembran ATR-FTIR-spektroskopisch verfolgt. Neben der Bestimmung der Sekundärstrukturzusammensetzung von membrangebundenem N-Ras Far/HD wurde untersucht, ob die Adsorption an die Membran mit einer Änderung der Sekundärstruktur einhergeht.

Die fortdauernde Existenz von Zellen hängt erheblich von ihren Fähigkeiten ab, Signale aus der Umgebung zu empfangen und auf passende Art und Weise auf diese zu antworten. Der Prozess der Signaltransduktion, z.B. das Weiterleiten von Signalen von der extrazellulären Matrix über das Zytoplasma in den Zellkern, beinhaltet unter anderem Proteine, die mit hydrophoben Strukturmerkmalen modifiziert sind, welche an das Peptidrückgrat angefügt sind. Posttranslationale Lipidierung durch Acylierung mit Fettsäuren, Alkylierung mit Prenylresten, Veresterung mit Cholesterol und Konjugation mit dem komplexeren Lipid Glycosylphosphatidylinositol (GPI) kommt bei einer breiten Vielfalt von intra- und extrazellulären Signalproteinen vor. Diese hydrophoben Modifikationen münden typischerweise in eine Membranbindungsaffinität des lipidierten Proteins, wodurch die Proteinlokalisierung und -funktion verändert wird. Während klassische Transmembranproteine die Membran durchspannen und auch hin und wieder lipidiert sind, verweilt die Mehrheit der lipidierten Proteine auf nur einer Seite der Membran. Nach Durchlaufen von intrazellulären Sortierpfaden ist der endgültige Bestimmungsort von GPI-verankerten Proteinen die extrazelluläre Schicht der Plasmamembran, wohingegen prenylierte und/oder acylierte Proteine sich typischerweise auf der inneren Seite der Plasmamembran oder an der Oberfläche der Endomembranen befinden. Die posttranslationale Lipidierung von Proteinen ist von besonderer physiologischer Bedeutung, da nicht nur die Funktion dieser Proteine bei der Signaltransduktion, sondern auch beim vesikulären Transport kontrolliert wird [Brunsveld et al., 2009; Pechlivanis & Kuhlmann, 2006].

Die drei Ras-Isoformen H-, N- und K-Ras sind durch Lipidierung am C-Terminus posttranslational modifiziert, was essentiell für die korrekte Funktion und die Lokalisation an der inneren Seite der Plasmamembran ist. Die Membrananker von H-, N- und K-Ras beherbergen alle einen C-terminalen S-Farnesyl- (Far) Cystein-Carboxymethylester, der mit einem (N-Ras) oder zwei (H-Ras) benachbarten S-Palmitoyl- (Pal) Cystein-Resten zusammenarbeitet bzw. einem polybasischen Strang von 6 Lysinresten beim K-Ras. In Bild 1.2 ist die Struktur von N-Ras mit verschiedenen möglichen Lipidierungsmustern abgebildet.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Proteinfaltung

Ein lebender Organismus kann bis zu etwa 100.000 verschiedene Proteine enthalten. Proteine spielen in den meisten biologischen Prozessen eine Hauptrolle und machen den größten Teil der Trockenmasse der Zelle aus. Für die biologische Aktivität ist die korrekte dreidimensionale Faltung des Proteins von entscheidender Bedeutung. In der Zelle findet die Proteinfaltung in einer komplexen, molekular dicht besiedelten Umgebung statt. Nach erfolgter Synthese an den Ribosomen muss sich das Protein *de novo* in einen spezifischen konformellen, als nativ bezeichneten Zustand falten, um seine biologische Aktivität ausführen zu können. Da sich das Protein nicht nur zufällig nach beliebig vielen Konformationsumwandlungen in den nativen Zustand faltet, was sehr lange Zeit in Anspruch nehmen würde (Levinthal-Paradoxon), sondern um viele Größenordnungen schneller dorthin gelangt, muss der Faltungsweg in einer gerichteten Weise zurückgelegt werden. Der Faltungsprozess wird von einer Reihe Hilfsproteine unterstützt. Das sind zum einen molekulare Chaperone, deren Hauptaufgabe es ist, die unvollständig gefaltete Polypeptidkette von nicht-produktiven Wechselwirkungen abzuschirmen, vor allem solchen, die in Aggregation resultieren. Zum anderen gibt es noch Faltungskatalysatoren, deren Aufgabe es ist, potentiell langsame Schritte bei der Proteinfaltung zu beschleunigen, z.B. bei der Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen und der Bildung von Disulfidbrücken. Dennoch muss die Information zur Faltung auch bereits in der Aminosäuresequenz des Proteins enthalten sein, da Proteine ihre korrekt gefaltete Struktur *in vitro* in Abwesenheit aller Hilfsfaktoren einnehmen, wenn die Bedingungen günstig gewählt sind [Anfinsen, 1973]. Durch die Annahme, dass Proteinfaltung nicht analog zu der Reaktion von kleinen Molekülen, wie z.B. dem Aufbrechen und Knüpfen von einer kleinen Zahl starker kovalenter Einfachbindungen abläuft, sondern dass das Protein seinen Faltungsweg auf einer „Energielandschaft“ von der entfalteten Polypeptidkette zum energetisch günstigen nativen Zustand sucht, können Proteinfaltungsprozesse heutzutage sehr gut theoretisch nachvollzogen werden [Dobson, 2001; Jahn & Radford, 2005]. Diese Energielandschaft ist zunächst einmal generell relativ flach, da sich die meisten Konformationen des Proteins auf einem ähnlichen Energieniveau befinden. Zufällige Fluktuationen der

ungefalteten oder teilweise gefalteten Zustände treiben die Reaktion in Richtung der nativen Konformation, da die Kontakte zwischen den Aminosäureresten, die der nativen Struktur näher kommen, als stabiler betrachtet werden als „nicht-native“ Kontakte. Im Falle des 98 Aminosäurereste langen Proteins Acylphosphatase genügen beispielsweise bereits Kontakte von 3 Aminosäureresten, um die Topologie für die Faltung dieses α/β -Proteins festzulegen [Vendruscolo et al., 2001]. Durch Zunahme der nativen Kontakte verringert sich mit der Zeit somit die Zahl von verfügbaren Konformationen, und das Energieminimum der nativen Konformation wird angesteuert („Faltungstrichter“, siehe Bild 2.1). Ein jedes Molekül kann hierbei entlang der Energiehyperfläche auf einer individuellen Trajektorie vom entfalteten Zustand zur nativen Konformation gelangen. Dabei können auch Faltungsintermediate durchlaufen werden, z.B. Zustände mit vielen nicht-nativen Kontakten.

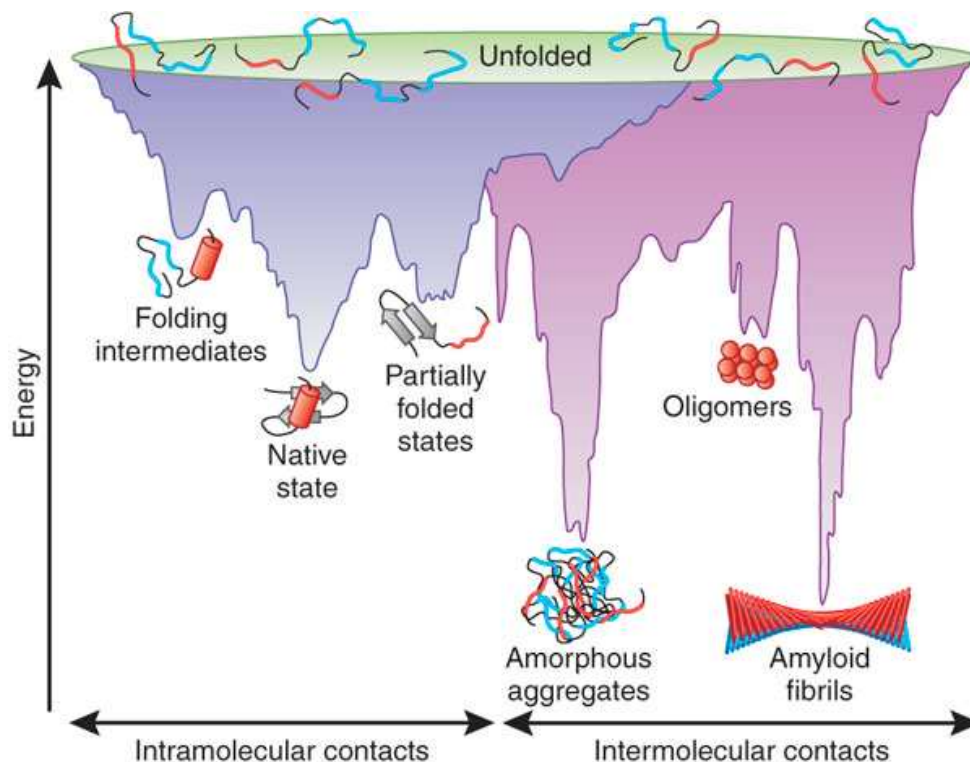


Bild 2.1: Schematische Energielandschaft für Proteinfaltung und -aggregation [Hartl & Hayer-Hartl, 2009].

Die Oberfläche des Faltungstrichters ist für eine jede Polypeptidsequenz bei festgelegten Umgebungsbedingungen einzigartig. Sie wird durch sowohl thermodynamische als auch kinetische Eigenschaften der sich faltenden Polypeptidkette bestimmt. Teilweise gefaltete Zustände in dieser Energielandschaft können jedoch auch zur Aggregation neigen, wenn günstige intermolekulare Kontakte auftreten. Das kann

zu einer Assoziation der Moleküle führen, und Proteinfehlfaltungskrankheiten, insbesondere Amyloidosen, können auftreten. Die Beschaffenheit der Energiehyperfläche im Bereich des Übergangs von intra- zu intermolekularen Kontakten ist so gut wie immer unbekannt, da es sehr schwierig ist, die teilweise gefalteten Zustände festzuhalten und zu charakterisieren [Jahn & Radford, 2005].

2.2 Amyloide

Der Begriff Amyloid (griech.: Amylon, lat.: Amylum = Stärke) bedeutet stärkeähnlich, auch stärkeähnliche Substanz. Er wurde 1854 von Rudolf Virchow eingeführt, als er unter Verwendung der besten wissenschaftlichen Methoden und dem medizinischen Wissen der damaligen Zeit Iod verwendete, um die zerebralen Corpora Amylacea aus dem Gehirngewebe von Verstorbenen einzufärben, welche eine abnorme, makroskopische Erscheinung aufwiesen. Als er entdeckte, dass sich die Corpora Amylacea bei Zugabe von Iod blassblau anfärbten und bei darauffolgender Zugabe von Schwefelsäure violett, schloss er, dass die Substanz, welche der offensichtlichen makroskopischen Veränderung unterlag, Zellulose sein musste und gab ihr den Namen Amyloid. Da die Unterscheidung zwischen Stärke und Zellulose zur damaligen Zeit unklar war, und als Unterscheidung zwischen dem Tier- und Pflanzenreich verwendet wurde, war ebenso unklar, ob Amyloide aus Zellulose oder Stärke bestanden [Sipe & Cohen, 2000].

Die moderne Begriffsdefinition ist eindeutig. Eindimensional aggregierte Proteine mit einer cross- β -Faltblatt-Anordnung der senkrecht zur Fibrillachse liegenden Peptidstränge heissen heute Amyloide [Cohen & Kelly, 2003]. Die Bildung fibrillärer Strukturen wird auch als „eindimensionale Kristallisation“ bezeichnet [Jarrett & Lansbury, 1993]. Die Fehlfaltung, Aggregation und Fibrillbildung von Proteinen wie A β (amyloid beta peptide), α -Synuclein oder hIAPP ist z.T. in neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson verwickelt und spielt auch bei der Schädigung von peripherem Gewebe eine Rolle, wie im Falle von Diabetes Mellitus [Chiti & Dobson, 2006; Engel, 2009].

Die Fibrillen können unter Verwendung von Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) oder Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) *in vitro* sichtbar gemacht werden. Diese Experimente offenbaren, dass die Fibrillen normalerweise aus Protofilamenten bestehen, welche im Durchmesser 2-5 nm betragen. Diese Protofilamente verwinden sich und formen seilähnliche Fibrillen, welche typischerweise 7-13 nm dick sind, oder sie assoziieren lateral und formen dann lange Bänder, welche 2-5 nm dick und bis zu 30 nm breit sind (siehe Bild 2.4). Die Fibrillen binden spezifisch Farbstoffe wie Thioflavin T (ThT), ein Fluorofor, und Kongorot (congo red, CR), welcher unter kreuzpolarisiertem Licht als grüne Doppelbrechung sichtbar wird [Chiti & Dobson, 2006]. Es wird eine wachsende Zahl an Proteinen ohne Verbindung zu

Proteinablagerungskrankheiten gefunden, die unter bestimmten Bedingungen *in vitro* fibrilläre Aggregate formen, und auch die entsprechenden morphologischen, strukturellen und farbstoffbindenden Eigenschaften besitzen, um sie als Amyloide klassifizieren zu können. Diese Entdeckungen führten zu der Annahme, dass die Fähigkeit, amyloide Strukturen zu formen, eine generelle, inhärente Eigenschaft aller Polypeptidketten ist [Uversky & Fink, 2004].

Die meisten Proteine finden leicht zu ihrem nativen Zustand, weil die Gibbs-Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger , welche die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt und den entfalteten und den Übergangszustand voneinander trennt, überwindbar ist, und der gefaltete Zustand substantiell stabiler als der ungefaltete Zustand ist (die Differenz der Gibbs-Energien ΔG legt die relativen Populationen von gefalteten und ungefalteten Proteinen fest) (Bild 2.2).

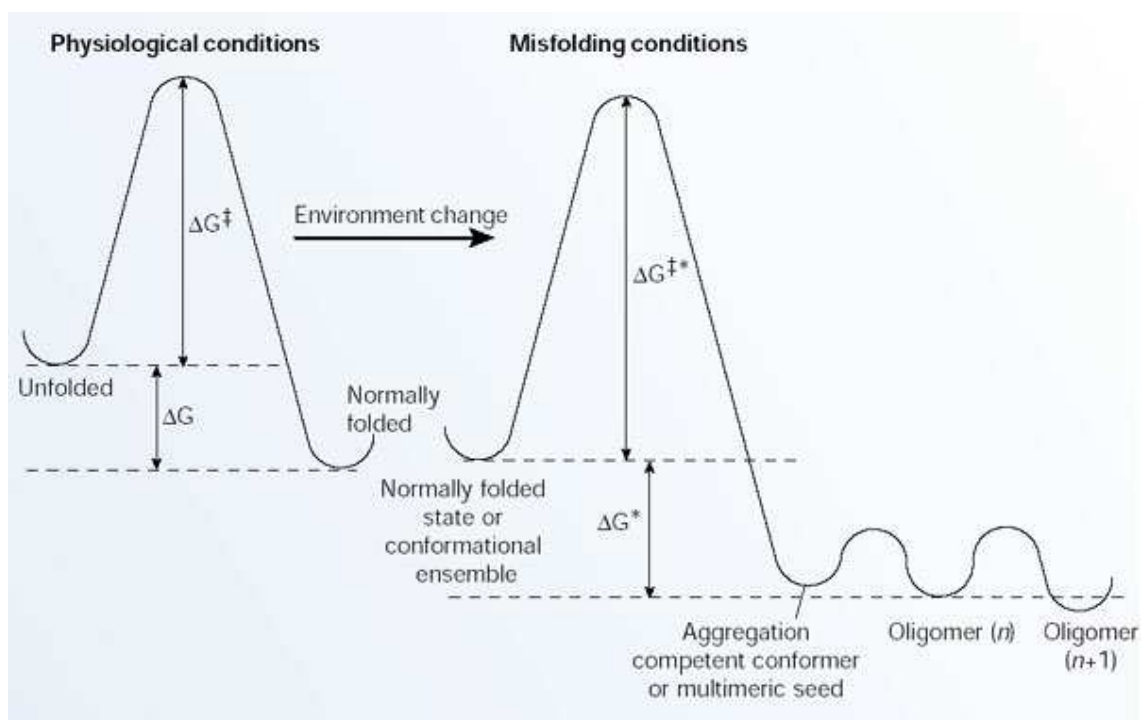


Bild 2.2: Diagramm der Gibbs-Energien bei Faltung unter physiologischen und denaturierenden Bedingungen. Die Differenz der Gibbs-Energie (ΔG) zwischen dem nativen Zustand und dem entfalteten Ensemble an Konformationen (entfalteter Zustand) bestimmt die relative Population eines jeden Zustandes. Die Gibbs-Aktivierungsenergie (ΔG^\ddagger) bestimmt, wie schnell sich eine Konformation in die andere umwandelt (links). Unter denaturierenden Bedingungen kann eine fehlgefaltete, zur Aggregation fähige Konformation gegenüber dem normal gefalteten, nativen Zustand als Konsequenz des Wechselspiels zwischen Sequenz und Umgebung bevorzugt werden (rechts). Zum Beispiel kann sich die Umgebung des Polypeptids als Folge von intra- oder extrazellulären Einflüssen verändern. Der Stern deutet an, dass ΔG^\ddagger hier die Barriere zwischen dem monomeren Konformer und einem Multimer ist, welches effizient oligomerisiert [Cohen & Kelly, 2003].

Unter bestimmten, zum Beispiel denaturierenden Bedingungen kann der fehlgefaltete, oligomere Zustand für zur Aggregation neigende Proteine stabiler sein als die funktionale, dreidimensionale Struktur. Glücklicherweise ist die kinetische Barriere $\Delta G^{\ddagger*}$, welche den nativen und den fehlgefalteten Zustand voneinander trennt, normalerweise in einer biologisch relevanten Zeitskala unüberwindbar, und in den meisten Fällen arbeiten die intrinsischen Räumungsmechanismen der Zelle effizient, so dass der Fehlfaltungsprozess mit anschließender Aggregation nicht stattfindet. Weil der Aggregationsprozess eine Multimerisierung der individuellen Ketten beinhaltet, hat $\Delta G^{\ddagger*}$ zwei Komponenten, eine, die sich auf die Konformation des Monomers bezieht, und eine zweite, die sich auf die Polymerisation bezieht, welche konzentrationsabhängig ist [Cohen & Kelly, 2003].

Amyloidosen sind eine Klasse von Krankheiten, welche durch die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen in einen fibrillären Zustand definiert sind [Hebda & Miranker, 2009]. Die an diesen Krankheiten beteiligten, normalerweise löslichen Proteine wie z. B. A β , α -synuclein und hIAPP lagern sich hierbei spontan zu β -faltblatthaltigen Fibrillen zusammen. Im Falle von A β und α -synuclein führt das zur Neurodegeneration, im Falle von hIAPP zur Verminderung der Masse von insulinproduzierenden, pankreatischen β -Zellen [Hull et al., 2004]. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass die Zelltoxizität wahrscheinlich nicht von den Fibrillen selber stammt, sondern dass vielmehr Zwischenstufen bei der Aggregation die toxischen Spezies sind. Beispielsweise haben post-mortem Untersuchungen von nicht an Alzheimer erkrankten Erwachsenen gezeigt, dass sich trotzdem A β -Plaques akkumuliert haben. Außerdem finden sich bei Typ 2 Diabetes Amyloidablagerungen nur bei > 90 % aller Patienten. Dass die restlichen 10 % keine signifikanten Mengen an Amyloiden aufweisen und die Beobachtungen bei Alzheimer legen nahe, dass die Zwischenstufen bei der Aggregation für die Erkrankungen relevanter sind. Während diese Krankheiten also bestimmten Proteinen zuzuschreiben sind, ist die fibrilläre Form des Proteins wahrscheinlich nicht die toxische Spezies [Hebda & Miranker, 2009].

Die Umwandlung von der nativen Form eines Proteins zur amyloiden Form geschieht normalerweise in drei Phasen: Während der Nukleationsphase verbleibt ein zur Aggregation fähiges Peptid, was amyloidogenen Bedingungen ausgesetzt wird, zunächst für eine gewisse Zeitspanne in disperser Form in Lösung und es bildet sich ein Nukleationskeim. Danach folgt die Wachstumsphase, während der die Fibrillbildung exponentiell zunimmt. Wird die Konzentration an verfügbaren Monomeren zu gering, klingt die Reaktion ab, und die stationäre Phase wird eingeleitet. Die Kinetik der Amyloidbildung wird durch den Nukleationsvorgang bestimmt. Die Umwandlung zur

fibrillären Form während der Wachstumsphase geschieht dann augenscheinlich in einem kooperativen Prozess, deren Zeitskala im Allgemeinen kürzer als die Nukleationsphase ist. Der Nukleationsvorgang repräsentiert eine Population von monomeren und/oder oligomeren Spezies, die sich zwar auf dem Reaktionspfad befinden, jedoch energetisch ungünstig sind. Diese Zustände werden nach und nach stabiler, je mehr Nuklei zu Fibrillen konvertieren. Die anschließende Verlängerung der Fibrille mit zusätzlichem Ausgangsmaterial ist ein energetisch begünstigter Prozess. Da der Nukleus der Fibrillbildung ein hochenergetischer Zustand ist, können Reaktionsbedingungen, die den Nukleus stabilisieren, als Katalysatoren wirken. Die Gegenwart von Oberflächen ist eine der wichtigsten solcher Bedingungen, wie sie bei allen *in vitro* Experimenten durch Gefäßwände und manchmal auch durch Luft/Wasser-Grenzflächen vorhanden sind. Sogar die Oberflächen der Fibrillen selbst können als katalytische Oberflächen betrachtet werden, an denen Nuklei stabilisiert werden (sekundäre Nukleation) [Hebda & Miranker, 2009].

2.3 Membranen

Alle Zellen lebender Organismen sind durch Membranen begrenzt. Die Membranen gewähren auch Begrenzungen für die Kompartimente im Inneren der Zellen. Alle Zellen besitzen eine Zelloberflächenmembran, die auch Plasmamembran (PM) genannt wird. Die Plasmamembran besitzt eine komplex gepackte, aus vielen Komponenten bestehende Struktur, dessen zentrales Element die Lipiddoppelschicht ist. Im Vergleich zur Größe der Zelle, die von der Lipiddoppelschicht umschlossen wird, ist diese extrem dünn. Die molekulare Zusammensetzung der Plasmamembran hängt vom Zelltyp ab. Das Gewichtsverhältnis von Proteinen und Lipiden kann von 1:5 bis zu 5:1 variieren. Polysaccharide sind mit weniger als 10 % der Trockenmasse in der Minderheit. Die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran ist außen von der aus Polysacchariden bestehenden Glykocalix und innen von dem gummibandartigen Zytoskelett, einem polymeren Proteinnetzwerk, bedeckt. Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell sind verschiedene integrale Proteine und Polypeptide in eine noch fluide Lipiddoppelschicht eingebettet, welche mit ihr hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen eingehen [Singer & Nicolson, 1972]. Die peripheren Membranproteine befinden sich außen an der Lipidschicht und werden vorzugsweise durch polare Wechselwirkungen (elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken) festgehalten. Eine schematische Zeichnung der Plasmamembran ist in Bild 2.3 dargestellt.

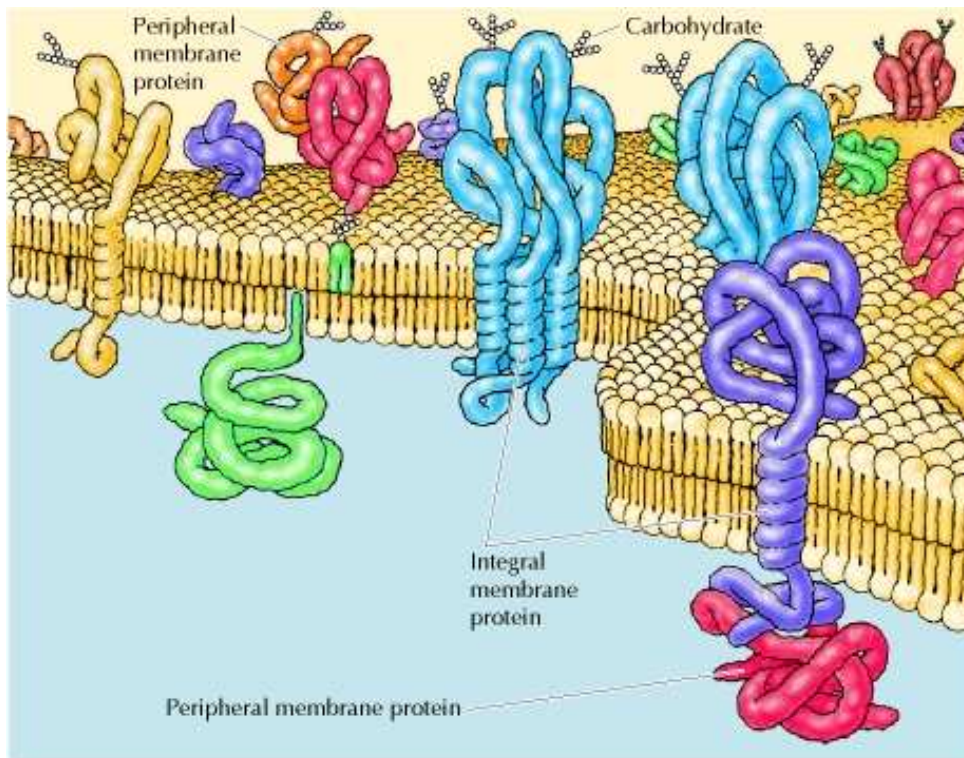


Bild 2.3: Modell einer Plasmamembran [Cooper, 2000].

Während prokaryotische Zellen nur eine Plasmamembran und einige weniger strukturierte interne Membransysteme besitzen, haben eukaryotische Zellen zusätzlich eine Anzahl wohldefinierter interner Membranen, welche mit dem Zellkern und den Organellen verbunden sind. Der das genetische Material der Zelle enthaltende Zellkern ist von einer porösen Doppelmembran umgeben. Diese Membran ist topologisch mit den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) verbunden, dem Hauptschauplatz der Synthese von Lipiden und Proteinen. Der Golgi-Apparat enthält ein sehr stark gefaltetes Agglomerat von Membranen. Dort werden die neu hergestellten Moleküle modifiziert, sortiert und für den Transport zu anderen Organellen oder dem Export aus der Zelle heraus verpackt. Die Membranen sowohl des Golgi als auch des ER sind morphologisch sehr komplex und weisen beträchtliche Krümmungen auf. Die Mitochondrien, welche ihre eigene DNA und RNA enthalten und ihre eigenen Proteine produzieren, enthalten zwei gewundene Membranen, eine innere und eine äußere. Die äußere Membran fungiert dabei als Sieb, welches die größeren Proteine in ihrem Kompartiment zurückhält. Lysosomen gehören zu den eher kleinen Organellen, welche durch eine Membran gebunden sind. Sie operieren als das Abfall- und Recyclingsystem der Zelle, indem sie Zersetzung, Abbau und Export von nicht gewollten Molekülen durchführen. Schließlich gibt es noch eine Reihe an Vesikeln, welche den weitläufigen

Verkehr unterstützen, der von der Zelle benötigt wird, damit Material innerhalb der Zelle und durch die Plasmamembran transportiert werden kann [Mouritsen, 2005].

Um die komplexen Zusammenhänge der Funktion von Biomembranen zu erforschen, werden oftmals stark vereinfachte Modellmembranen verwendet, die aus synthetischen oder aufgereinigten natürlichen Lipiden bestehen können. In dieser Arbeit werden neben den einfachen DOPC-Doppelschichten und negativ geladenen Membranen, welche Anteile von Lipiden mit negativ geladenen Kopfgruppen enthalten, auch ternäre Lipidmischungen verwendet, welche aus Lipiden mit gesättigten und ungesättigten Acylketten sowie Cholesterol bestehen [Jeworrek et al., 2008]. Diese weisen eine Phasenkoexistenz einer cholesterolreichen, flüssig-geordneten (l_o) Phase mit einer cholesterolarmen flüssig-ungeordneten Phase (l_d) auf. Solche Lipidsysteme sollen die in Biomembranen vorkommenden flüssig-geordneten Domänen nachahmen, die sich wie „Flöße“ (engl.: „rafts“) auf dem „See“ der flüssig-ungeordneten Biomembran bewegen [Simons & Ikonen, 1997]. Die Raft-Domänen sind reich an Sphingomyelinen und Cholesterol und sind wichtig für zelluläre Funktionen wie die Signal-Transduktion (siehe Abschnitt 2.3.2) und das Sortieren und den Transport von Lipiden und Proteinen.

2.3.1 Einfluss von Membranen auf amyloidogene Proteine

Oftmals wird die Aggregation der amyloidogenen Peptide durch Lipidmembranen induziert. Im Falle von A β , α -Synuclein und hIAPP befindet sich das monomere Peptid in entfalteter oder höchstens teilweise strukturierter Form in Lösung. Bei Kontakt mit der Membran bindet es sich an diese und nimmt α -helicale Struktur an. Für viele amyloidogenen Proteine wurden α -helicale, membrangebundene Zustände beobachtet, die mit der Amyloidbildung im Zusammenhang stehen. Die Ähnlichkeiten legen einen gemeinsamen Mechanismus nahe, der dabei hilft, den Zusammenhang zwischen Amyloidbildung und Zelltoxizität aufzuklären, sobald er richtig verstanden wird.

Biologische Membranen präsentieren eine allgegenwärtige Oberfläche, welche das Potential besitzt, als Katalysator für die Fibrillbildung zu wirken. Tatsächlich beschleunigen Lipiddoppelschichten die Umwandlung von nativem hIAPP zu Fibrillen, deren dominante Sekundärstrukturelemente intermolekulare β -Faltblätter sind [Knight & Miranker, 2004; Abschnitt 4.2]. Bei der Katalyse an Oberflächen sind drei ausschlaggebende Faktoren zu berücksichtigen: Erstens wird die lokale Konzentration durch Adsorption an der Oberfläche erhöht. Da die Amyloidbildung eine Polymerisationsreaktion ist, ist die Reaktionsordnung grundsätzlich > 0 , was in einer

großen Sensitivität gegenüber der Proteinkonzentration resultiert. Zweitens kann die Oberfläche den Molekülen eine bevorzugte Orientierung verleihen. Dadurch wird die Ordnung der Peptidstruktur an der Oberfläche erhöht und intermolekulare Wechselwirkungen werden geordneter und begünstigen die Aggregation. Die Erhöhung der Ordnung impliziert einen signifikanten Verlust an Entropie. Das Ausmaß, mit dem die durch die Oberfläche verliehene Ordnung mit der Amyloidstruktur übereinstimmt, wird durch die physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche bestimmt. Drittens muss die Oberfläche immer wieder regeneriert werden, um als Katalysator zu dienen. Mechanistisch könnte das dadurch zu erklären sein, dass die intrinsische Drehung eines β -Faltblattes ($\sim 15^\circ$ pro Peptidstrang) mit der Adsorption an eine planare, zweidimensionale Oberfläche nicht kompatibel ist. Die Gibbs-Energie eines nicht verdrehten β -Faltblattes, welches an eine Oberfläche adsorbiert ist, wird größer als die desselben β -Faltblattes, welches verdreht ist und sich in Lösung befindet [Knight & Miranker, 2004].

2.3.2 Verteilung von Ras in Membranen

Abgesehen von der Verteilung über die verschiedenen subzellulären Kompartimente verteilt sich Ras auch innerhalb von spezifischen Membranen wie der Plasmamembran. Hierbei ist die Lokalisierung zwischen Raft- und Nicht-Raft-Domänen von Interesse. Zum Beispiel ist die Proteinalmyoylierung wahrscheinlich ein Raft-ansteuerndes Signal. Obwohl die verzweigten Prenylgruppen nicht besonders gut in die hochgeordneten Raftdomänen passen dürften, wurde gezeigt, dass H-Ras auch zu Raftdomänen hingelenkt wird. Interessanterweise hängt die Verteilung von Ras in die Raft- und Nicht-Raft-Membranstrukturen von der GTP-GDP-Beladung ab. Das isoformspezifische Nanoclustern beruht auf einem komplexen Zusammenspiel der verschiedenen Typen an Lipidankern, der hypervariablen Region, Gerüstmolekülen, der Membran und möglicherweise Membranrezeptoren. Zum Beispiel weisen H-Ras und K-Ras durch Aktivierung eine langsamere Diffusion auf. H-Ras wurde am intensivsten untersucht und es zeigte sich, dass das Protein im GDP-beladenen Zustand eine hohe Affinität zu Raft-Domänen aufwies. Es wird angenommen, dass K-Ras eine geringe Affinität zu cholesterolreichen Regionen in der Membran hat, während N-Ras seine Affinität zu Raftmembranen durch GTP-Beladung zu erhöhen scheint. Die verschiedenen Affinitäten der GDP- und GTP-gebundenen Ras-Proteine zu den Raft-Domänen scheinen die verschiedenen Signalübertragungsprozesse, in die Ras an der Plasmamembran involviert ist, zu spezifischen Subkompartimenten an der

Plasmamembran hinzusteuern. Die Aggregation (Clustering) der verschiedenen Ras-Proteine in verschiedenen Membran-Mikroumgebungen könnte eine Erklärung für die deutlich verschiedenen biologischen Antworten der verschiedenen Ras-Isoformen liefern. Abhängig vom Subkompartiment der Plasmamembran, in dem sich die entsprechende Ras-Isoform einlagert und dann clustert, werden unterschiedliche Wechselwirkungen mit anderen membranassoziierten Proteinen, Effektoren und Gerüstproteinen möglich, wodurch sich die verschiedenen biologischen Effekte der drei Ras-Isoformen erklären ließen [Brunsveld et al., 2009].

2.4 hIAPP und Diabetes Mellitus Typ 2

Das Polypeptid hIAPP (engl.: human islet amyloid polypeptide), auch Amylin genannt, ist ein Hormon des Pankreas und wird von dessen β -Zellen zusammen mit Insulin und deren Proproteinen (Proinsulin und proIAPP, siehe Abschnitt 2.5) kosezerniert [Hull et al., 2004]. Es wird angenommen, dass monomeres hIAPP ein Hormon ist, welches hauptsächlich bei der Magenentleerung und der Regulierung der Glukose-Homöostase eine Rolle spielt. Auch wenn nur wenige Details über die genaue physiologische Funktion bekannt sind, gibt es Hinweise, dass hIAPP an spezifische membrangebundene Rezeptoren bindet. Aufgrund der wesentlich stärkeren Neigung zur Amyloidbildung von hIAPP im Vergleich zu Insulin, Proinsulin und proIAPP, wird hIAPP als Hauptschuldiger für den Verlust von β -Zellen bei T2DM-Patienten angesehen. Bei Diabetes Typ 2 lagern sich hIAPP-Fibrillen im extrazellulären Bereich des Pankreas ab. Der Massenverlust an β -Zellen ist ein zentrales Merkmal der Diabeteskrankheit und tritt zusammen mit der Bildung der Amyloidplaques auf. In seiner löslichen Form ist hIAPP ein ungeordnetes, am C-Terminus amidiertes, 37 Aminosäuren langes Peptid mit einer intrinsischen Disulfidbrücke zwischen Aminosäure 2 und 7. Vieles spricht für eine enge funktionelle Beziehung zwischen hIAPP und Insulin. Die Expression ist koreguliert, die Peptide werden von einem gemeinsamen Satz an Konvertasen prozessiert, sie werden gemeinsam gepackt und sind ihrem Abbau durch das Enzym IDE (insulin-degrading enzyme) unterworfen.

Unmodifiziertes, Wildtyp-hIAPP aggregiert bereits bei Konzentrationen von $\sim 10 \mu\text{M}$ in Puffer in einer Zeitskala von Minuten bis Stunden. Da hIAPP ein sezerniertes Protein ist, ist seine physiologische Konzentration um einige Größenordnungen höher. Dass deren Amyloidose nicht gemeinhin in gesunden Individuen beobachtet wird, liegt zum Teil daran, dass die hIAPP-Fibrillbildung durch das kosezernierte Insulin verhindert wird, welches im 50-100fachen molaren Überschuss gegenüber hIAPP sezerniert wird. Bemerkenswerterweise genügt ein substöchiometrischer Gehalt an Insulin, um die hIAPP-Aggregation in Lösung zu verhindern. Störungen der normalen hIAPP-Insulin-Physiologie durch Umgebungseinflüsse könnten daher die hIAPP-abhängige Diabetes auslösen [Hebda & Miranker, 2009].

Es wird vermutet, dass die Wechselwirkung von hIAPP mit den Membranen der β -Zellen eine entscheidende Rolle für dessen Toxizität und den Tod der insulinproduzierenden β -Zellen spielt. Der Diabetes Typ 2 geht eine systemische

Insulinresistenz voran, welche zunächst durch eine erhöhte Insulinsekretion behoben wird. Die erhöhte Sekretion wird zwingend von einer ebenfalls erhöhten hIAPP-Sekretion begleitet. Die sich entwickelnde hIAPP-Toxizität führt dann zu einer fortschreitenden Verminderung der Population an β -Zellen, die eigentlich für den erhöhten Insulinbedarf benötigt werden. Deshalb benötigen Diabetespatienten in späteren Stadien der Krankheit Insulinzugabe [Hebda & Miranker, 2009]. Diabetes Typ 2 kann als eine Proteinefehlfaltungskrankheit klassifiziert werden, und ist neben über 20 anderen Krankheiten bekannt, die durch fehlgefaltete und aggregierte Peptide und Proteine zustande kommen, darunter Alzheimer, Parkinson und Prionenkrankheiten [Chiti & Dobson, 2006]. Die Wechselwirkung zwischen amyloidogenen Peptiden/Proteinen und Membranen ist nicht nur für Diabetes relevant, sondern wird mittlerweile als genereller Mechanismus für amyloidinduzierte Zelltoxizität für die meisten Amyloidkrankheiten angesehen [Engel, 2009].

Die nach neuesten Erkenntnissen vermutlich toxischen Zwischenstufen bei der hIAPP-Aggregation sind, wie die Fibrillen auch, keine reinen, morphologisch homogenen Spezies, sondern repräsentieren vielmehr einen Satz an Spezies verschiedener Größen und Formen (Polymorphie) und zeichnen sich durch Variationen in Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen aus. Von den verschiedenen hIAPP-Spezies ist die Struktur der fibrillären Konformation noch am besten bekannt, obwohl es die am wenigsten lösliche ist. Die Stabilität der Fibrillen hat zu einer relativ leichten Handhabbarkeit beigetragen und deren Studium ermöglicht. hIAPP-Fibrillen werden von Proteasen nicht abgebaut und werden nur unter für biologische Verhältnisse aggressiven Bedingungen, wie z.B. durch Ameisensäure oder organische Lösemittel, aufgelöst. Im Gegensatz dazu erschwert sich das Studium von monomerem und oligomerem hIAPP in physiologischem Puffer durch deren Instabilität und rasche Aggregation. Der Großteil an struktureller Information über hIAPP-Fibrillen stammt von Fibrillen, die *in vitro* gebildet wurden. Die Herstellung von Fibrillen durch Auflösen des hIAPP-Monomers in physiologischem Puffer und anschließendes Inkubieren über Stunden oder Tage gestaltet sich relativ einfach. Methoden wie Elektronenmikroskopie, Elektronenresonanz-Spektroskopie, Röntgenbeugung und Kernspinresonanz-Spektroskopie haben das Verständnis der hIAPP-Fibrillstruktur deutlich verbessert. *In vitro* gebildete Fibrillen von hIAPP oder hIAPP-Fragmenten können verschiedene cross- β -Strukturen und Morphologien aufweisen. Für die verschiedenen beobachteten Fibrill-Morphologien existieren verschiedene Modelle zur Struktur [Engel, 2009]. Eines davon ist in Bild 2.4 dargestellt [Kajava et al., 2005]. Hier besteht die Fibrille aus drei Protofilamenten, jedes davon wird aus der Aneinanderreihung von hIAPP-Molekülen

gebildet, wobei sich die Aminosäuren 9-37 in einer planaren S-Form falten, um die β -Faltblatt-Struktur einzunehmen. Studien von hIAPP-Fibrillen aus Langerhans-Inseln des Pankreas haben gezeigt, dass der morphologische Charakter der Fibrillen im Wesentlichen dem von *in vitro* gebildeten Fibrillen entspricht. Manche gröbere Merkmale wie z.B. die Anzahl der Protofilamente von *in vivo* Fibrillen sind jedoch immer noch unbekannt. Letztlich verbleibt die wichtige ungeklärte Frage, welche Fibrill-Morphologie in der Nähe von β -Zellen gegenwärtig ist, und ob es eine Fibrill-Morphologie gibt, die zytotoxisch ist oder ob die Zelltoxizität aus Oligomeren resultiert.

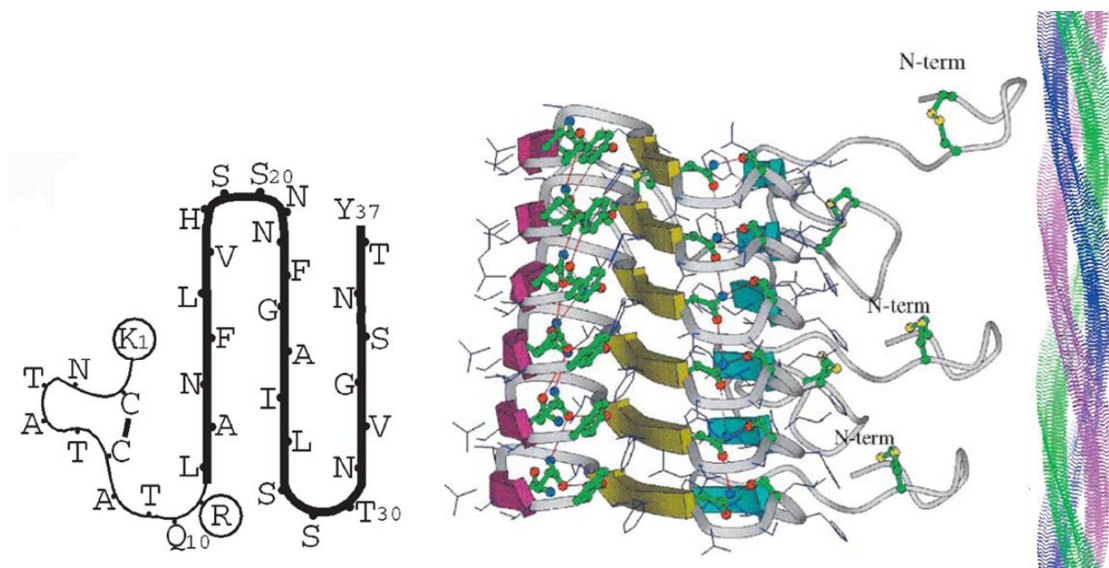


Bild 2.4: Strukturmodell einer hIAPP-Fibrille. Links: Faltung der hIAPP-Monomereinheit in einer planaren S-Form. Mitte: Protofilament durch Aneinanderreihung des Monomers in β -Faltblattanordnung. Rechts: Verdrehung von 3 Protofilamenten zu einer Fibrille [Kajava et al., 2005].

Im Vergleich zu den detaillierten strukturellen Informationen, die es für hIAPP-Fibrillen gibt, sind die Kenntnisse über die Struktur von hIAPP-Oligomeren geringer und wesentlich weniger detailliert. Das Wissen über die hIAPP-Oligomerstruktur stammt ausschließlich von *in vitro* produzierten Oligomeren [Green et al., 2004; Porat et al., 2003]. Auch ist nicht sicher, ob hIAPP-Oligomere immer reaktive Zwischenprodukte sind, also durch das Fibrillenwachstum verbraucht werden, oder nicht [Engel, 2009].

Auch über das hIAPP-Monomer, das für die meisten Studien synthetisch hergestellt wird, gibt es nur wenige strukturelle Informationen. Es ist als in seiner nativen Form entfaltetes Peptid charakterisiert worden, welches typische ungeordnete CD- und IR-Spektren aufweist [Goldsbury et al., 2000; Jha et al., 2009; Abschnitt 4.1]. NMR-Experimente legen nahe, dass die hIAPP-Peptidkette ungefaltet ist, jedoch ein Teil der

Kette dynamisch eine α -helicale Struktur einnimmt [Yonemoto et al., 2008]. Die schnelle, spontane Aggregation von hIAPP in wässriger Umgebung ist ein Hindernis für das Studium der strukturellen Charakteristiken des hIAPP-Monomers in Lösung. Zugabe von SDS oder Bindung an eine Membran ergibt stabilisierte, mehrheitlich α -helicale monomere hIAPP-Zustände [Apostolidou et al., 2008]. Es wird auch vermutet, dass die Wechselwirkung von monomerem hIAPP mit Insulin die Neigung von hIAPP zur Ausbildung helikaler Strukturen erhöht. Sie scheint jedoch stark von den physikalischen Formen des hIAPP und Insulin (lösliches oder fibrilläres hIAPP bzw. lösliches oder kristallines Insulin) abzuhängen. Sowohl Insulin als auch die Lipide scheinen helikale Strukturen zu induzieren, haben jedoch einen gegensätzlichen Effekt auf die hIAPP-Aggregation. Lipide haben die Tendenz, die hIAPP-Aggregation zu beschleunigen [Knight & Miranker, 2004], während Insulin als Inhibitor der hIAPP-Fibrillbildung bekannt ist [Westermarck et al., 2006; Hebda & Miranker, 2009]. Aus den Effekten von Lipiden und Insulin auf die Sekundärstruktur von hIAPP-Monomeren *in vitro* ließe sich ableiten, dass hIAPP *in vivo* durch Wechselwirkung mit physiologischen Bindungspartnern strukturiert wird, da Insulin und Lipide beide in den sekretorischen Vesikeln, den zellulären Speichern von hIAPP und Insulin, vorhanden sind [Engel, 2009].

hIAPP besitzt mehrere positiv geladene Aminosäurereste, von denen alle am N-terminalen Ende des Peptids lokalisiert sind. Diese N-terminalen Reste sind neben der Bindung mit Insulin [Gilead et al., 2006] vor allem an der initialen Wechselwirkung von hIAPP mit den Lipiden beteiligt, insbesondere den negativ geladenen [Knight & Miranker, 2004; Engel et al., 2006; Lopes et al., 2007]. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von hIAPP an Membranen am effektivsten ist, wenn die Membran negativ geladene Lipide enthält [Apostolidou et al., 2008; Jha et al., 2009; Abschnitt 4.2]. Dennoch sind sie nicht die einzigen beteiligten Wechselwirkungen, sondern es spielen höchstwahrscheinlich auch hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle. Bemerkenswert ist, dass die sieben N-terminalen Reste inklusive der Disulfidbrücke für die Zelltoxizität nicht von Bedeutung sind. Es wurde gezeigt, dass außer dem N-Terminus auch weitere Reste in Kontakt mit der Membran kommen, wenn hIAPP an eine Phospholipid-Doppelschicht bindet. Eine Studie hat kürzlich unter Verwendung von SDSL (site-directed spin labeling) und EPR-Spektroskopie Details der α -helikalen Struktur von monomerem hIAPP gezeigt, welches an große, unilamellare Vesikel (LUV) gebunden ist, die aus 80 % POPS und 20 % POPC bestehen [Apostolidou et al., 2008]. Es wurde herausgefunden, dass Aminosäuren 9-22 eine α -Helix bilden, welche parallel zur Membranoberfläche orientiert ist und auf Höhe der Phospholipid-Kopfgruppen in die

Membran eingebettet ist. Von den meisten dieser Aminosäurenreste wird auch angenommen, dass sie an der Bildung von cross- β -Strukturen in der hIAPP-Fibrille beteiligt sind. Der Anteil von 80 % negativ geladenen Lipiden ist gegenüber der Situation *in vivo* (~25 % negativ geladene Lipide) sehr unterschiedlich. Dadurch wird der helikale Zustand in zellulärer Umgebung weniger wahrscheinlich. Die Beobachtung, dass physiologische Anteile von negativ geladenen Lipiden ausreichen, die hIAPP-Fibrillbildung zu beschleunigen, unterstützt jedoch die Annahme, dass vorübergehende helikale Strukturen eine Rolle bei der hIAPP-Aggregation *in vivo* spielen könnten [Jayasinghe & Langen, 2005]. Negativ geladene Lipide sind bevorzugt auf der zytosolischen Seite der Zellmembran lokalisiert, wo sie nur den intrazellulären hIAPP-Spezies zugänglich sind. Konsequenterweise könnte die Membranzerstörung durch Fibrillwachstum [Engel et al., 2008], welche unabhängig von der Gegenwart von negativ geladenen Lipiden auftritt, biologische Membranen von beiden Seiten beeinträchtigen. Die zuvor genannte EPR-Studie bestätigt auch frühere Studien, in denen anhand von CD- und IR-Spektroskopie gezeigt wurde, dass hIAPP helikale Strukturen einnimmt, wenn genügend negativ geladene Lipide zugegen sind [Jayasinghe & Langen, 2005; Knight et al., 2006; Lopes et al., 2007].

2.5 proIAPP

hIAPP wird in den β -Zellen des Pankreas als Prohormon proIAPP zusammen mit Proinsulin produziert. Der Kosekretion geht zunächst eine Reihe von Prozessierungsschritten voraus. Zunächst wird die Knüpfung einer Disulfidbrücke zwischen Cys13 und Cys18 im rauhen endoplasmatischen Retikulum durchgeführt. Dann folgt die Prozessierung durch die Prohormon-Konvertasen PC 2 und PC 1/3 (auch als Furin bezeichnet) in den sekretorischen Granula der β -Zellen. Hierbei werden 19 Reste am C-Terminus (PC 1/3) und 11 Reste am N-Terminus (PC 2) entfernt. Durch die Aktivität der Carboxypeptidase E wird anschließend das Grunderkennungsmotiv für PC 1/3 vom Peptid entfernt (Lys-Arg) [Higham et al., 2000; Marzban et al., 2005]. Das reife hIAPP wird erhalten, nachdem Gly38 durch das Enzym PAM (peptidyl amidating monooxygenase complex) entfernt und der offenstehende Carboxy-Terminus von Tyr37 amidiert wurde [Sanke, 1988]. Bild 2.5 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der hIAPP-Erzeugung aus proIAPP.

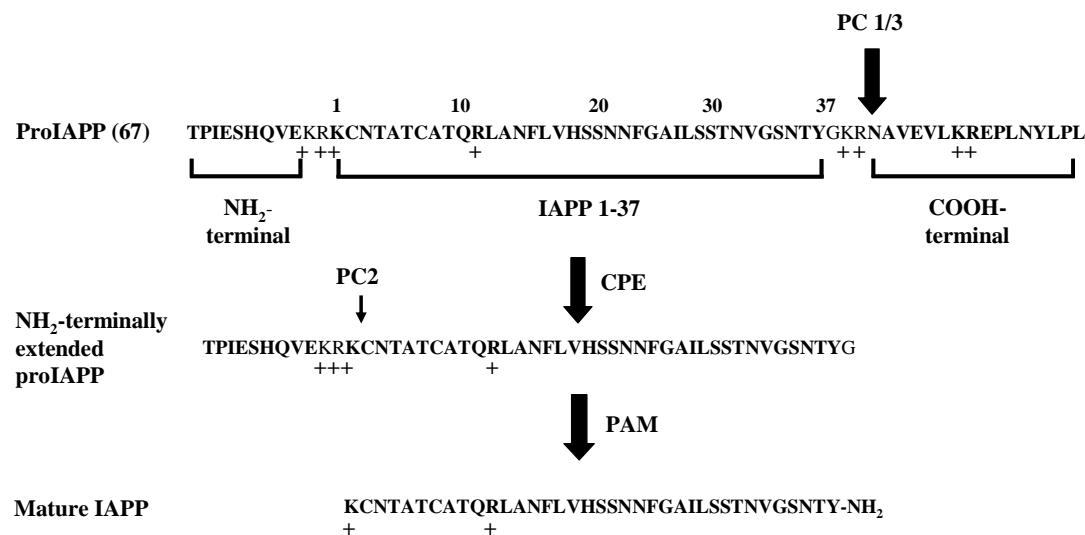


Bild 2.5: Prozess der Verarbeitung von proIAPP in den β -Zellen des Pankreas [Jha et al., 2009].

Wird die Zelle durch einen Reiz zur Sekretion stimuliert, wird das reife hIAPP zusammen mit reifem Insulin in den extrazellulären Raum befördert. In einer Computersimulation und theoretischen Überlegungen an einem hIAPP-Fragment wurde kürzlich eine Erklärung für die unterdrückte Aggregation in molekular eng besiedeltem

zellulärem Milieu vorgebracht, die auf statistischer Mechanik von Aggregationsphänomenen in endlich großen Systemen beruht [Singh et al., 2008]. Der beobachtete Effekt könnte eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung der intrazellulären Aggregation von stark unlöslichen amyloidogenen Proteinen wie hIAPP spielen, wohingegen die Aggregation im extrazellulären Raum bei gleicher Proteinkonzentration unvermeidlich wäre.

Die Vorstufe von T2DM wird von einem erhöhten Bedarf an Insulin begleitet, wodurch bei Sekret-Stimulation mehr unreife sekretorische Granulen mit einem größeren Anteil an Proprotein (proIAPP und Proinsulin) freigesetzt werden. Weiterhin wurden im prädiabetischen Zustand erhöhte Anteile an freien Fettsäuren gefunden. Es wird angenommen, dass β -Zellen, die einer Hyperlipidämie ausgesetzt sind, ihre Membranen remodulieren, so dass der Anteil negativ geladener Lipide höher wird. Im prädiabetischen Stadium scheint sich der Anteil anionischer Lipide an der Membran über den physiologischen Bereich (10-30 %) hinaus zu erhöhen, wodurch die Aggregationsneigung von hIAPP, wie in Abschnitt 2.4 bereits erwähnt, signifikant zunimmt. Die frühen Stadien der hIAPP-Bildung sind immer noch unklar, doch Autopsie-Studien von T2DM-betroffenen menschlichen Pankreaten haben gezeigt, dass die Ablagerung von Amyloiden ein extrazelluläres Ereignis ist. Studien an Nacktmäusen mit transplantierten Langerhans-Inseln und Transgen-Mäusen, die hIAPP exprimieren, haben Hinweise geliefert, dass die frühen Stadien der Amyloidbildung intrazellulär stattfinden könnten. Die intrazellulären Aggregate zeigten im Falle von teilprozessiertem proIAPP Immunreaktivitäten, was die Vermutung bestärkt, dass teilprozessiertes proIAPP bei der frühen, intrazellulären Amyloidbildung bedeutend sein könnte, und dass die falsche Prozessierung des Peptids die Amyloidablagerung auslösen könnte. Die Neigung zur Amyloidbildung vermindert sich mit der Zunahme an geladenen Resten, die den amyloidogenen hIAPP-Kern direkt flankieren, was auf den Unterschied von teilprozessiertem und vollständigem proIAPP zutrifft [Yonemoto et al., 2008].

2.6 Inhibitoren der Aggregation von hIAPP

Therapeutische Maßnahmen gegen Proteinfehlfaltungskrankheiten können durch Medikamente, die die Beseitigung von fehlgefalteten/aggregierten Proteinen beschleunigen und durch Medikamente, die die Stabilität des nativen Zustands verbessern oder die kinetische Barriere zur Aggregation erhöhen, angegangen werden [Cohen & Kelly, 2003]. Es gibt bis jetzt keine zugelassenen Mittel, die zur letzten Kategorie gehören, obwohl die Verhinderung der Aggregation ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ 2 und anderer Amyloidkrankheiten ist.

2.6.1 Molekülinhibitoren

Aufgrund fehlender Kenntnisse über den Aggregationsmechanismus amyloidogener Proteine/Peptide und fehlender struktureller Informationen über deren oligomere und prefibrilläre Zustände ist es schwierig, wirkungsvolle Inhibitoren gezielt herzustellen. Aufgrund der Erkenntnis, dass kleine aromatische Moleküle, wie z. B. Kongorot und Thioflavin T, spezifisch mit Fibrillen wechselwirken und auch die Fibrillbildung verhindern können, hat sich die Anzahl an Veröffentlichungen über diese Gruppe von Substanzen in den letzten Jahren immer mehr gehäuft. Es stellte sich heraus, dass bestimmte Polyphenole den Zelltod in Zellkulturen unter Einwirkung amyloidogener Proteine/Peptide dramatisch vermindern. Gleichmaßen wurden viele dieser Verbindungen auch als effiziente *in vitro* Inhibitoren der Ausbildung amyloider Fibrillen charakterisiert. Schließlich wurde dazu übergegangen, die riesige Substanzklasse der Polyphenole systematisch nach effektiven Inhibitoren der Fibrillbildung zu durchkämmen (engl.: screening) [Porat et al., 2006]. Vorteile von Molekülinhibitoren im Gegensatz zu den Peptidinhibitoren sind ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können, die Vermeidung von immunologischen Reaktionen und die Stabilität in biologischen Flüssigkeiten und biologischem Gewebe.

Da amyloide Fibrillen auf molekularer Ebene generelle Merkmale wie die Ausbildung intermolekularer cross- β -Faltblätter mit starken Wasserstoffbrücken gemeinsam haben, könnten entsprechende Studien an anderen Amyloiden wie A β oder dem Tau-Protein (τ) dabei helfen, Strategien für die Inhibition der Ausbildung von hIAPP-Amyloiden zu finden. Eine Gruppe von Phenolen mit mehr als einem aromatischen Phenolring wurde

bereits als Inhibitor von A β , α -Synuclein und amyloidogenen Prionen ausgemacht [Porat et al., 2006]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass das Polyphenol (-)-Epigallocatechin-Gallat (EGCG) zur Aggregation neigende Proteine, wie A β und α -Synuclein, in ein vom Aggregationspfad abseits gelegenes Nebenprodukt verwandeln („off-pathway“) und dadurch die Fibrillbildung verhindert [Ehrnhoefer et al., 2008]. Eine Phenolverbindung, die in Rotwein vorkommt, Resveratrol, hat sich gegen die Aggregation von A β (25-35) als effektiv erwiesen. Es reduziert außerdem den Gehalt an sezerniertem und intrazellulärem A β [Marambaud et al., 2005]. Zwei weitere, auf einem Rhodaningerüst basierende Inhibitoren mit sehr niedriger Zelltoxizität wurden bei einer Studie zur Inhibition der τ -Aggregation gefunden [Bulic et al., 2007]. In Bild 2.6 sind die Strukturformeln der Molekülinhibitoren dargestellt.

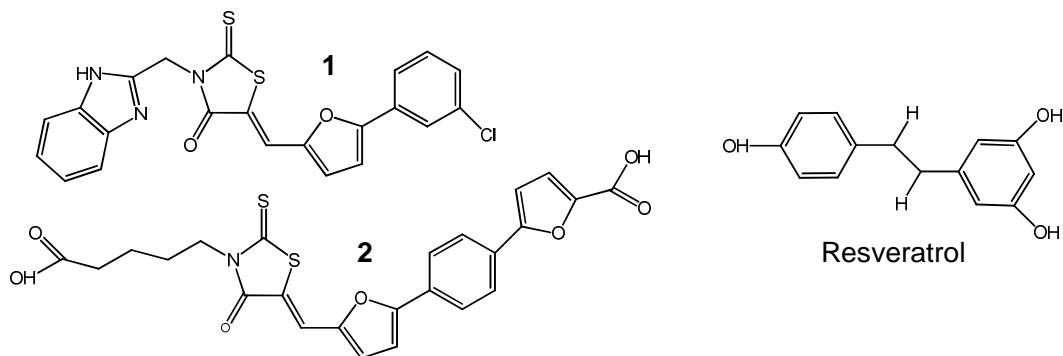


Bild 2.6: Strukturformeln der auf dem Rhodaningerüst basierenden Molekülinhibitoren (links: **1** und **2**), sowie Resveratrol (rechts).

2.6.2 Peptidinhibitoren

Neben den kleinen Molekülinhibitoren wurde eine weitere Klasse an Inhibitoren entwickelt, welche aus kurzen synthetischen Peptiden bestehen, die von hIAPP-Sequenzen abgeleitet sind und hIAPP-Selbsterkennungsdomänen (engl.: self recognition motifs) enthalten. Es wurde gezeigt, dass einige dieser Sequenzen die hIAPP-Fibrillbildung verhindern, jedoch sind nur wenige davon in der Lage, gleichermaßen auch die Zelltoxizität zu reduzieren [Tenidis et al., 2000; Scrocchi et al., 2002]. Durch die Einführung konformeller Einschränkungen in Form von N-Methylierung von zwei ausgewählten Amidbindungen in kurzen hIAPP-Sequenzen, die eine amyloidogene Kernregion enthalten, konnten diese in eine gut lösliche, nichtamyloidogene und nicht zelltoxische Form überführt werden [Kapurniotu et al., 2002].

Die Peptide NF(N-Me)GA(N-Me)IL (im Folgenden als NFGAIL-GI abgekürzt) und das neuere [(N-Me)G24, (N-Me)I26]-IAPP (IAPP-GI) sind auf der gleichen Seite des Peptidrückgrats zweifach N-methyliert, so dass sie in der Lage sind, mit ihrem amyloidogenen Vorgänger hIAPP zu interagieren und die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrücken zu unterbinden („ β -Brecher“). NFGAIL-GI bindet mit hoher Affinität (Dissoziationskonstante K_d im submikromolaren Bereich) an hIAPP und vermindert die zytotoxischen Zusammenlagerungs- und Fibrillationsprozesse in Lösung. IAPP-GI ist ein konformell eingeschränktes Analogon von hIAPP. Es enthält anstelle der hIAPP-Kernsequenz NFGAIL die N-methylierte Sequenz NF(N-Me)GA(N-Me)IL. Alle anderen Aminosäurenreste sind mit denen von hIAPP identisch. IAPP-GI ist ein sehr gut lösliches, nicht-amyloidogenes und nicht-zelltoxisches hIAPP-Analogon, was in Lösung an hIAPP mit sehr hoher Affinität bindet (K_d im nanomolaren Bereich). Während NFGAIL-GI zwar die Aggregation inhibiert, nicht aber in der Lage ist, bereits begonnene Aggregationsprozesse aufzuhalten, stoppt IAPP-GI nicht nur die Aggregation, sondern löst sogar bereits in wässriger Phase gebildete hIAPP-Oligomere und -Fibrillen wieder auf [Tatarek-Nossol et al., 2005; Yan et al., 2006]. In Bild 2.7 sind die Aminosäuresequenz von hIAPP und des modifizierten IAPP-GI, sowie ein möglicher Mechanismus der Reversion der Aggregation von hIAPP durch IAPP-GI dargestellt.

2.7 N-Ras

Neben integralen Membranproteinen gibt es auch Proteine, die sich an die Membranoberfläche binden und mit ihr assoziieren. Durch posttranslationale Lipidmodifikation entwickeln sonst in der wässrigen Phase lösliche Moleküle eine Affinität zur Membran und binden sich an diese reversibel. Membranbindung durch Insertion von hydrophoben Lipidgruppen ist für ~10 % aller zellulären Proteine relevant. Die kleine GTPase Ras ist ein lipidmodifiziertes Protein, welches eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion spielt. Bis vor kurzem war die strukturelle Basis für die Membranbindung von Ras nicht besonders gut bekannt. Durch neue Synthesetechniken und Fortschritte verschiedener biophysikalischer Methoden wurden jedoch einige strukturelle und dynamische Eigenheiten über die Membranbindung von Ras-Proteinen aufgeklärt [Brunsveld et al., 2009].

Die Modifikation von löslichen Proteinen mit Lipiden begünstigt die Membranbindung, wodurch die diffusive Mobilität dieser Proteine von drei auf zwei Dimensionen beschränkt wird. Damit einher gehen signifikante Effekte der biomolekularen Wechselwirkungen der Proteine sowohl mit Lipiden, als auch mit Effektorproteinen. Eine einfache Lipidierung, z.B. Farnesylierung oder Myristoylierung, verleiht dem Protein nur eine eingeschränkte Membranaffinität, was in einer raschen Dissoziation des Moleküls von der Membran resultiert. Farnesylierte oder myristoylierte Proteine weisen daher in der Regel mehr als ein membransteuerndes Element auf. Das können ein oder mehrere Lipide, wie z.B. ein oder zwei zusätzliche Palmitoyl-Thioesterfunktionen, sein. Interessanterweise ist dieses neben der Prenylfunktion zweite membransteuernde Element oft von reversibler Natur. Ein Cystein-Thioester kann hydrolysiert und ein polybasischer Aminosäurenabschnitt kann teilweise durch Phosphorylierung der benachbarten Serine ausgeglichen werden. Da eine solche Lipidierung der Proteine auch einen Weg bietet, die Proteinlokalisierung und deren Wechselwirkungen reversibel zu beeinflussen, ist sie ein vielseitiger Kontrollmechanismus für die biologische Funktion dieser Signalproteine.

Die Lipidierung der Proteine leitet sie zu Membranen, unter anderem zur Plasmamembran. An der Plasmamembran, jedoch nicht ausschließlich dort, wirken die lipidierten Proteine oftmals als signaltransduzierende Proteine, welche extrazelluläre Signale von Transmembranrezeptoren von der Zelloberfläche an nicht-membrangebundene intrazelluläre Effektoren weitergeben. Die Lokalisation dieser

Proteine an der Membranoberfläche erlaubt eine effiziente Komplexbildung aufgrund der erhöhten effektiven Konzentration der Proteine und der zweidimensionalen Natur der Membran. Proteinklassen, bei denen die Signaltransduktion über deren membrangebundenen Zustand reguliert wird, sind die (trimeren) G-Proteine, die Tyrosinkinasen der Src-Familie, sowie kleine monomere G-Proteine.

Ein Beispiel für eine wichtige, kleine Unterfamilie der monomeren G-Proteine, die bei der zellulären Signalübertragung eine große Rolle spielen, sind die Ras-Proteine. Der Prozess der Signaltransduktion, in den Ras involviert ist, findet an der Oberfläche von Membranen statt. An der Plasmamembran wird dieses z.B. durch die Bindung eines Signalmoleküls an eine membrandurchspannende Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) und eine anschließende Dimerisierung der Rezeptoren ausgelöst. Es folgt eine Autophosphorylierung der Rezeptoren und die Rekrutierung von Austauschfaktoren (z.B. Sos, welcher durch das Adapterprotein Grb2, growth-factor-receptor-binding-protein 2, rekrutiert wird), welche anschließend den Nukleotid-Austausch von Ras anregen, und es damit aktivieren. Darauf folgt die Wechselwirkung von Ras mit Effektoren, wie der Raf-Kinase oder der Phosphatidylinositol-3-Kinase und somit die in der Signalkaskade weiter abwärts gerichtete Signalweiterleitung. In Bild 2.8 ist ein solcher Signalweg schematisch dargestellt.

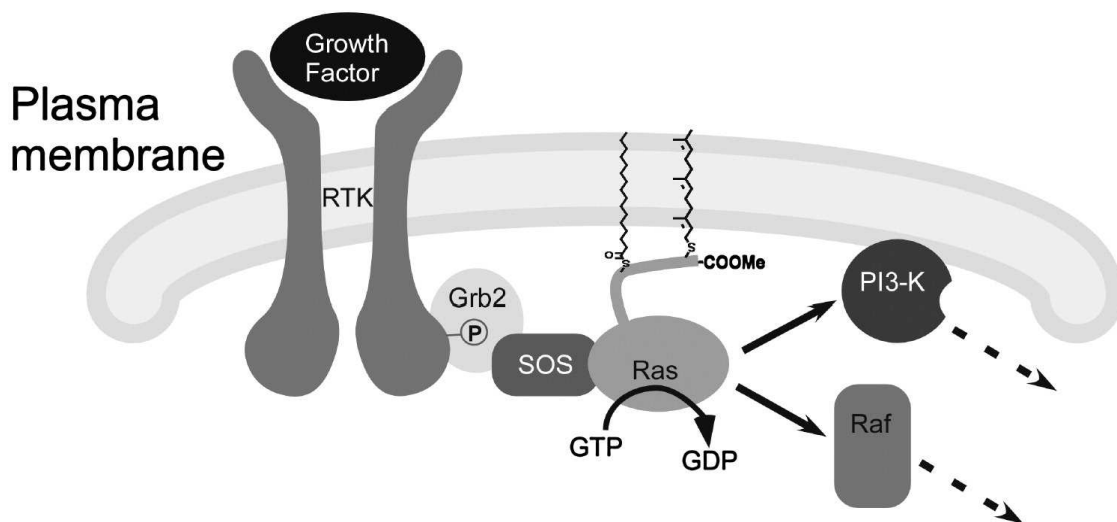


Bild 2.8: Schematischer Überblick über die Signaltransduktion an der Plasmamembran durch Ras. RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase, Grb2: growth-factor-receptor-bound protein 2, SOS: son of sevenless, Raf: Raf-Kinase, PI3-K: Phosphoinositid-3-kinase [Brunsveld et al., 2009]

Neben der Regulierung der Signaltransduktion spielt die Lokalisierung von lipidierten Proteinen an der Membran ebenfalls eine wichtige Rolle beim vesikulären Transport, bei Protein-Protein-Wechselwirkungen und bei der Membranzusammensetzung. Trotz

der enormen biologischen Bedeutung der Membranbindung von lipidierten Proteinen, insbesondere von Ras, sind genaue Informationen über Details, die diesen Prozess betreffen, sehr eingeschränkt. Mehrere Studien haben z.B. die Dynamiken des löslichen N-Terminus von Ras angegangen, jedoch blieben molekulare Informationen über den lipidierten C-Terminus für lange Zeit auf der Strecke. Nichtsdestotrotz wurden in den letzten Jahren Fortschritte erzielt, was strukturelle Einsichten in die Membranbindung von lipidierten Ras-Peptiden und -Proteinen angeht. Dies ist zum Teil auch durch neue chemisch-biologische Ansätze gelungen, bei denen die Herstellung der lipidierten Ras-Modellpeptide und des vollständig prozessierten Ras-Proteins mit fortgeschrittenen biophysikalischen Charakterisierungstechniken kombiniert wurden.

Ras-GTPasen gehören zur Klasse der monomeren G-Proteine, welche an zellulären Prozessen wie dem vesikulären Transport, dem Zellzyklus, der Einschleusung in den Zellkern und der Signaltransduktion beteiligt sind. Diese G-Proteine nehmen ihren aktiven Zustand durch die Bindung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) ein, wohingegen die Bindung von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) den inaktiven Zustand stabilisiert (GTP-GDP-Schalter). Die aktive Form wirkt durch Wechselwirkung mit Effektoren stimulierend oder inhibierend auf zelluläre Prozesse. Die Hydrolyse vom GTP zum GDP resultiert in einer Deaktivierung der Proteine. Die Mißregulierung dieser molekularen Schalter hat oft verheerende Konsequenzen, weshalb ihnen eine hohe Bedeutung beigemessen wird. Eindrückliche Beispiele dafür können bei vielen Krebsarten gefunden werden, wo oftmals mutierte Ras-Proteine beobachtet werden, die im GTP-gebundenen Zustand arretiert sind. Diese Ras-Proteine verbleiben daher permanent in ihrer aktiven Form, was zusammen mit zusätzlichen Störungen bei den Signal-Transduktionsprozessen in unkontrolliertem Zellwachstum resultiert.

Mitglieder der Ras-Superfamilie werden durch Prenylierung und in manchen Fällen durch Acylierungsreaktionen posttranslational modifiziert. Die zwei häufigsten Typen der posttranslationalen Lipidmodifikation, die in der Ras-Superfamilie angetroffen werden, sind die *S*-Palmitoylierung und die *S*-Isoprenylierung. Die Isoprenylierung ist eine stabile (nicht-reversible) Modifikation, wohingegen die Palmitoylierung ein reversibler Prozess ist. Zusätzlich werden einige Proteine der Ras-Superfamilie posttranslational in C-terminale Methylester konvertiert.

Die Ras-Proteine sind eine Untergruppe der Ras-Superfamilie, wobei die drei Isoformen H-, N- und K-Ras die bekanntesten Beispiele dieser Gruppe sind. Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen zwischen diesen Ras-Proteinen befinden sich vor allem in deren C-terminaler hypervariabler Region. Dieser augenscheinlich ungeordnete

terminale Part enthält die Signalsequenzen für die posttranslationalen Modifikationen und reguliert die Membranbindung der Proteine. Wie für andere lipidierte Proteine auch, wurden die meisten Experimente mit diesen Molekülen, welche auf das molekulare/strukturelle Verständnis des Ras-Proteins und dessen Wechselwirkungen abzielten, bis vor kurzem am löslichen Teil des Moleküls durchgeführt, also dem Protein ohne den C-Terminus, oder mit Methoden mit niedriger räumlicher Auflösung. Die Ergebnisse dieser Versuche können bestenfalls eine Näherung der echten Situation wiedergeben. Insbesondere der wichtige Membran-Bindungsmechanismus konnte bei diesen Studien nicht angegangen werden. Dabei ist dieses umso notwendiger, als die hauptsächlichsten molekularen Unterschiede zwischen den individuellen Ras-Mitgliedern in der hypervariablen Region (HVR), inklusive des lipidierten Teils des Proteins am C-Terminus, zu finden sind.

Die biochemische Generierung der vollfunktionalen und modifizierten lipidierten Proteine ist kompliziert und zeitraubend. Im Fall der *S*-Palmitoylierung führt sie beispielsweise zu heterogenen Mischungen, was in den meisten Fällen weder zweckmäßig noch brauchbar ist. Daher wurden in den letzten Jahren chemisch-biologische Ansätze entwickelt, welche Zugang zu vollfunktionalen, lipidierten Ras-Peptiden und -Proteinen ermöglicht und darüber hinaus zu zusätzlichen nicht-natürlichen Modifikationen. Das konnte vor allem durch zwei Techniken erreicht werden, die mehr oder weniger parallel entwickelt wurden: (i) Fortschritte auf dem Feld der Proteinligation und dem Feld der Proteinsynthese und (ii) Fortschritte auf dem Feld der lipidierten Peptidsynthese. Diese Entwicklungen und deren Anwendung in der chemischen Biologie wurden genutzt, um ungelöste Fragen der Membranbindung von Ras-Proteinen zu untersuchen und zu erklären.

Zellstudien haben gezeigt, dass die Lokalisation der Ras-Proteine in verschiedenen subzellulären Membrankompartimenten teilweise durch die verschiedenen posttranslationalen Lipidmodifikationen der unterschiedlichen Isoformen reguliert wird. Durch eine chemisch-biologische Herangehensweise mit semisynthetischen Proteinen konnte gezeigt werden, dass die Lipidanker des N-Ras-Proteins die schnelle und reversible Verteilung über die verschiedenen Membranen kontrollieren. Die Verwendung von semisynthetischen Ras-Proteinen hat gezeigt, dass Ras rasch zwischen der Plasmamembran (PM) und dem Golgi-Apparat in einem Kreislauf hin- und herwechselt, und dass dieser Kreislauf die räumlich-zeitliche Verteilung und die Aktivität von H-Ras und N-Ras steuern. Weiterhin haben diese Experimente gezeigt, dass der retrograde PM-Golgi-Verkehr von N-Ras durch eine Depalmitoylierung/Repalmitoylierung vermittelt wird, die an verschiedenen subzellulären Orten stattfindet.

Zusammen mit dem anterograden Transport wird ein Kreislauf generiert, der die verschiedenen PM- und Golgi-Lokalisationen von Ras bedingt (Bild 2.9).

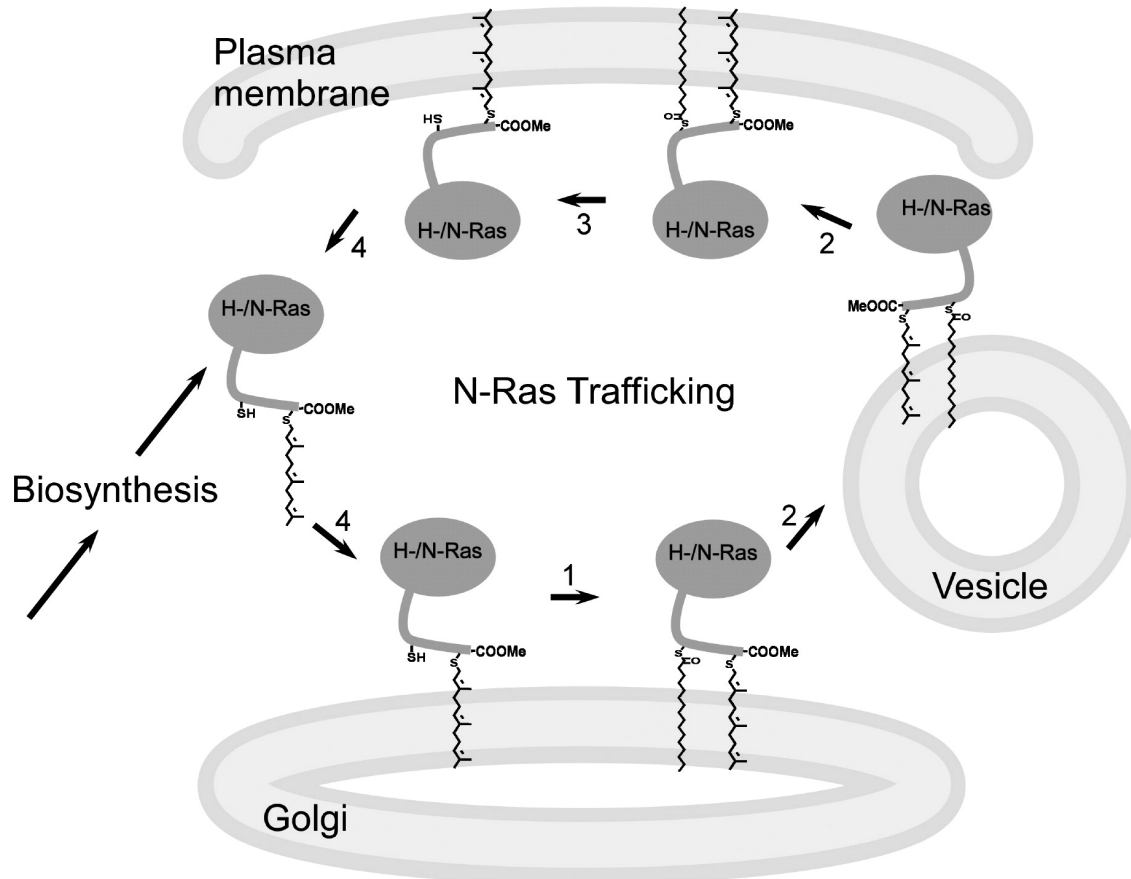


Bild 2.9: N-Ras-Zyklus vom Golgi zur PM und zurück. S-Palmitoylierung des N-Ras findet am Golgi statt (1), gefolgt vom gerichteten vesikulären Transport zur PM (2) wo das Protein nach Hydrolyse des Thioesters freigesetzt wird (3) und über einen nicht-vesikulären Transportweg zurück zum Golgi gelangt (4) [Brunsveld et al., 2009]

Der Palmitoylierungs-Zustand ist für die Regulation des Austausches von Ras zwischen der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat von Bedeutung. Depalmitoylierung von Ras sorgt für einen raschen Austausch zwischen den Membranen (da depalmitoyliertes Ras sich zu gleichen Teilen im Cytosol und den Membranen aufhält). Repalmitoylierung findet am Golgi statt und hat zur Folge, dass Ras stabil in die Membran integriert wird und zurück zur PM dirigiert wird, wo es seine Signalaktivität ausübt. Ohne diesen Zyklus der De- und Reacylierung würde das palmitoylierte N-Ras inkorrekt in irgendeinem Membrankompartiment lokalisiert verbleiben und seine spezifische Aktivität verlieren.

2.8 ATR-FTIR-Spektroskopie von Membran-Protein-Systemen

Die Bestimmung der Struktur eines Biomoleküls ist oft ein sehr wichtiger Schritt, um ein Verständnis des Wirkungsmechanismus zu erhalten. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um ein Protein, eine Nukleinsäure, ein Kohlenhydrat, ein Lipid oder eine Biomembranstruktur handelt. Es ist daher wichtig, Methoden zur Verfügung zu haben, die rasch solche nützlichen strukturellen Informationen liefern. Bei den hochauflösenden Strukturuntersuchungen von Biomolekülen gibt es jedoch leider gewisse Einschränkungen. So kann zwar die vollständige dreidimensionale Struktur eines Proteins mit hoher Auflösung durch Röntgenkristallographie und andere Diffraktometrie-Techniken bestimmt werden. Bei diesen Techniken muss das Protein jedoch eine wohlgeordnete, kristalline Struktur einnehmen, was bei vielen Biomolekülen nicht möglich ist. Eine Alternative zu den Diffraktometrie-Techniken ist die multidimensionale Kern-Magnetresonanz-Spektroskopie (NMR), welche gegenüber der Diffraktometrie den Vorteil hat, dass Strukturen in Lösung bestimmt werden können. Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Interpretation von NMR-Spektren von großen Molekülen komplex ist, so dass die Anwendung gegenwärtig noch auf relativ kleine Moleküle (~25 kDa) beschränkt ist. Weiterhin ist die NMR-Spektroskopie für die Untersuchung von Membranproteinen aufgrund der nichtisotropen Bewegung des Proteins in der Lipidmatrix eingeschränkt, so dass die Verwendung von Lipidvesikeln meistens nicht möglich ist. Stattdessen müssen entweder organische Lösemittel oder mizellbildende Detergentien verwendet werden, um die hydrophobe Membranumgebung nachzuahmen. Diese Einschränkungen haben zur Entwicklung von Alternativmethoden geführt, die Einsichten in die Struktur von Biomolekülen auch unter den für hochauflösende Methoden problematischen Bedingungen geben können, ohne allerdings die vollständige dreidimensionale Information zu liefern, darunter die CD und vibronische (Raman- und IR-) Spektroskopie.

Die Infrarot-Spektroskopie ist eine klassische Methode zur Strukturbestimmung von kleinen Molekülen, da sie eine hohe Sensitivität gegenüber der chemischen Zusammensetzung und dem Aufbau von Molekülen besitzt. Der hohe Informationsgehalt eines Infrarotspektrums ist auch übertragen auf biologische Systeme gegeben. Daher ist die Infrarotspektroskopie ein wertvolles Mittel zur Untersuchung von Proteinstrukturen, molekularen Mechanismen von Proteinreaktionen sowie Proteinfaltung, -entfaltung und -fehlfaltung [Barth, 2007]. Das Herzstück eines modernen Fourier-Transform-Infrarotspektrometers ist ein Interferometer, wie z.B. das Michelson-Interferometer (Bild 2.10).

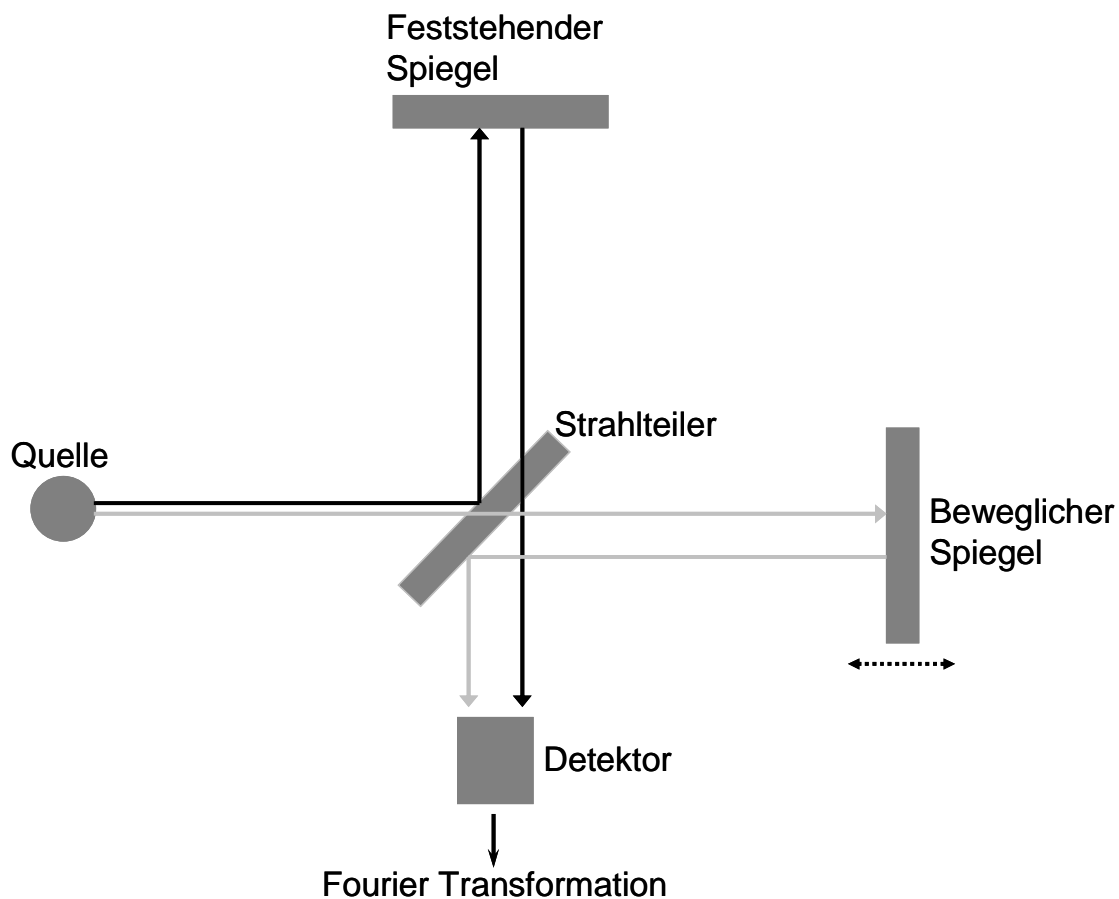


Bild 2.10: Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers.

Der Infrarotstrahl wird hier zunächst durch einen Strahlteiler halbiert. Die Hälfte des Strahls wird an einem festen und die andere Hälfte an einem beweglichen Spiegel reflektiert. Durch den beweglichen Spiegel wird die Wegstrecke des einen Strahls variiert. Beide Strahlen gelangen zurück zum Strahlteiler, wo sie rekombinieren und je nach optischer Wegdifferenz konstruktiv oder destruktiv interferieren. Die

Lichtintensität relativ zur Position des beweglichen Spiegels, welche vom Detektor aufgenommen wird, wird als Interferogramm bezeichnet, und ist die fourier-transformierte Form des Infrarotspektrums. Durch eine mathematische Fourier-Transformation durch den Computer wird das Interferogramm nun in die Wellenzahldomäne überführt, und man erhält das Spektrum.

Die IR-Spektroskopie lässt sich auf Proteine anwenden, die unter den verschiedensten Bedingungen vorliegen können, z.B. in wässriger und nicht-wässriger Lösung und in Membranen. Es gibt eine große Zahl an Schwingungsbanden, die für Peptidgruppen und Seitenketten charakteristisch sind und aus denen Informationen über die Proteinstruktur gewonnen werden können. Von diesen kann die Amid-I-Bande besonders gut für die Sekundärstrukturcharakterisierung von Proteinen herangezogen werden. [Byler & Susi, 1986]. Die Amid-I-Bande ist z.B. nützlich, um den Einfluss von Änderungen der Temperatur, des Druckes, des pH-Wertes oder des Lösemittels auf die Struktur des Proteins zu verfolgen. Die Information über die Sekundärstruktur wird dabei durch eine Anpassung der Amid-I-Bande mit Gauss-Lorentz-Kurven erhalten, wobei eine jede Kurve eine Teilbande repräsentiert, die durch die Amid-I-Schwingungsmoden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zustandekommt. Die Lage einer jeden Komponente wird durch Verstärkung der Bandenauflösung durch Methoden wie die Fourier-Selbstentfaltung und die zweite Ableitung bestimmt. Durch Anwendung empirischer Regeln werden die einzelnen Subbanden dann den jeweiligen Sekundärstrukturelementen zugeordnet [Byler & Susi, 1986; Fabian & Mäntele, 2002; Barth, 2007]. Die Regeln wurden durch Messung der Amid-I-Bande von Polypeptiden und Proteinen erhalten, deren Strukturen von einer der typischen Sekundärstrukturen, wie z.B. α -Helix, β -Faltblatt oder Zufallsknäuel, dominiert sind.

In Tabelle 2.1 sind die Wellenzahlbereiche innerhalb der Amid-I'-Region den jeweiligen Sekundärstrukturen zugeordnet (ein Strich im Namen einer Bande, z.B. Amid-I', bedeutet, dass D₂O als Lösungsmittel eingesetzt wird).

Tabelle 2.1: Zuordnung der Amid-I'-Bandenlage zu den Sekundärstrukturen [Barth, 2007].

Sekundärstruktur	Bandenposition in D ₂ O / cm ⁻¹	
	Mittelwert	Extrema
α-Helix	1652	1642-1660
β-Faltblatt	1630, 1679	1615-1638, 1672-1694
Schleifen	1671	1653-1691
Ungeordnete Strukturen	1645	1639-1654

Das oben genannte Verfahren hat jedoch auch seine Schwächen. Z. B. basiert die Zuordnung der β-Schleifen nicht auf beobachteten IR-Spektren von isolierten β-Schleifen. Die IR-Banden der β-Schleifen sind vermutlich so breit, dass sie mit der Region der α-Helix-Banden überlappen. Da 3₁₀-Helices nicht in die oben genannten empirischen Regeln einbezogen sind, könnte die Analyse der Amid-I-Region zu falschen Ergebnissen führen, wenn die untersuchten Proteine signifikante Anteile dieser Sekundärstruktur aufweisen. Sogar für Analysen von Proteinen mit hohen α-Helix- oder β-Faltblattanteilen nach den empirischen Regeln stimmen die Proteinstrukturen nicht immer mit solchen überein, die mit anderen Methoden bestimmt wurden. In der Region 1640-1620 cm⁻¹ sind teilweise auch Banden präsent, wenn das Protein hohe α-helicale Anteile, aber keine β-Faltblätter aufweist (auf Basis von Röntgenstrukturanalysen ermittelt), wie z.B. im Falle von Myoglobin und Hämoglobin [Byler & Susi, 1986]. Die IR-Banden in diesem Wellenzahlbereich werden nach den empirischen Regeln den β-Faltblättern zugeordnet. Im Falle von Parvalbumin und Calmodulin zeigt der Vergleich der Protein-Kristallstruktur mit den beobachteten Amid-I-Banden, dass die Amid-I-Komponenten sowohl im Bereich 1650-1640 cm⁻¹ als auch 1660-1650 cm⁻¹ von α-Helices stammen. Starke Wasserstoffbrücken der Peptidgruppen mit Lösungsmittelmolekülen und eine Verzerrung der Helixstruktur sind mögliche Ursachen der niederfrequenten α-Helixbande. Bei vielen Proteinen, die signifikante Anteile an β-Faltblättern aufweisen, werden zwei oder mehr Banden im Bereich

1640-1620 cm^{-1} beobachtet. Mögliche Ursachen der Banden im Bereich $< 1630 \text{ cm}^{-1}$ sind starke intermolekulare Wasserstoffbrücken sowie auch die Verzerrung der Proteinstruktur wie im Falle der niederfrequenten α -Helixbanden [Torii & Tasumi, 1996]. Nicht zuletzt ist auch zu beachten, dass die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Sekundärstrukturelemente unbekannt sind, so dass die Angabe von absoluten Zahlen der Sekundärstrukturanteile fehlerbehaftet sein kann. Beispielsweise fällt der Anteil von β -Faltblättern bei FTIR-spektroskopisch ermittelten Proteinstrukturen gegenüber den mit hochauflösenden Verfahren ermittelten Sekundärstrukturzusammensetzungen häufig zu groß aus. Die Bestimmung von relativen Änderungen der Sekundärstruktur liefert jedoch zumeist schon wichtige Hinweise über mögliche Reaktionsmechanismen bzw. Antworten, welche Konformationsänderungen bei Änderung äußerer Einflüsse wie Temperatur, Druck, etc. stattfinden.

Bei einem wie in Bild 2.11 schematisch dargestellten ATR-FTIR-Experiment lässt sich das interne Reflexionselement (IRE) mit einer oder mehreren Lipidschichten bedecken, die rekonstituierte Membranproteine enthalten können [Tatulian, 2003]. Bei Auftragung einer reinen Lipidmembran können membranaffine Proteine auch anschließend injiziert werden, die dann an die Membran adsorbieren. Die Absorption der Energie der evaneszenten Welle durch die Lipidmembran und das inserierte bzw. adsorbierte Protein führt zu ATR-Spektren, die eine Fülle an Informationen über die Struktur des untersuchten Systems liefern. Da die Eindringtiefe der evaneszenten Welle (typische Werte siehe Bild 2.14) weit über die Dimensionen der größten Proteine hinausgeht, gibt es keine Einschränkungen, was die Größe des Proteins angeht. Aufgrund der großen Wellenlänge von Infrarotlicht ist Lichtstreuung kein Problem, anders als z.B. bei CD- oder Fluoreszenzexperimenten im UV-Bereich. Durch Verwendung von polarisiertem Licht lässt sich auch die Orientierung des Proteins gegenüber den Membranlipiden bestimmen, was normalerweise bei den hochauflösenden Methoden nicht gegeben ist.

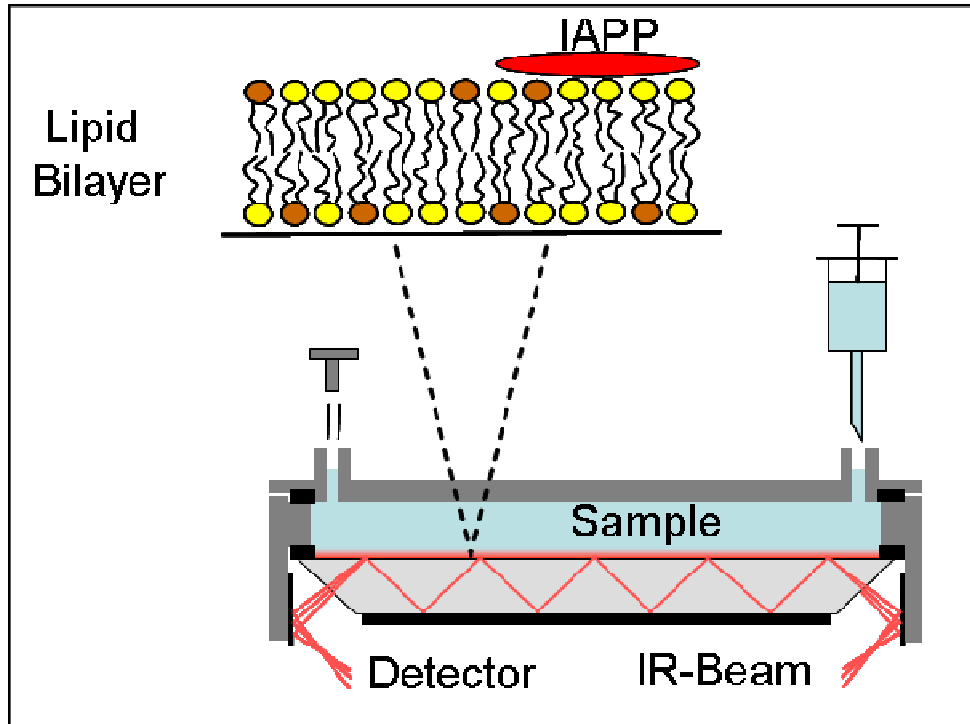


Bild 2.11: Schematischer Aufbau eines ATR-Experimentes. Es werden nur Moleküle spektroskopisch erfasst, die sich im Eindringbereich der evaneszenten Welle des IR-Strahls befinden ($<1 \mu\text{m}$ von der Oberfläche entfernt, roter Streifen über dem in grau dargestellten ATR-Kristall) [Mishra et al., 2008].

Gegenüber der IR-Spektroskopie in Transmission hat die ATR den Vorteil, dass aufgrund von Adsorption die lokale Konzentration im Bereich der evaneszenten Welle erhöht wird. Das führt dazu, dass wesentlich kleinere Probenkonzentrationen möglich sind als bei der Transmission ($\sim 0,01\%$ vs. $\sim 0,3\%$ w/w). Die Methode ist außerdem gegenüber Staubpartikeln und Luftblasen recht unempfindlich, die im Falle der Transmission zu Streuung führen können. Da IR-aktive Gegenionen, wie z.B. Trifluoracetat (TFA), in Lösung verbleiben, werden sie nicht von der evaneszenten Welle erfasst. Ein Nachteil der ATR-Methode ist die schwierigere Evaluierung quantitativer Ergebnisse, da die effektive Eindringtiefe P_{eff} , welche die Durchstrahldicke $d_{\text{Transmission}}$ im Lambert-Beer'schen Gesetz ersetzt, nur näherungsweise bestimmt werden kann (siehe Gleichungen (2.4) bis (2.9)). Ein weiterer Nachteil kann abhängig von der verwendeten ATR-Zelle der im Vergleich zur Transmission große Bedarf an Probenvolumen sein.

Bei der hier verwendeten Methode der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) wird die Tatsache ausgenutzt, dass Licht beim Übergang von einem Medium mit einem hohen Brechungsindex n_1 in ein Medium mit einem niedrigen Brechungsindex n_2 durch Beugung abgelenkt wird (Lichtbrechung) [Fringeli, 1992; Fabian & Mäntele, 2002].

Es gilt das Brechungsgesetz von Snellius:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.1)$$

Der Lichtstrahl mit dem Einfallswinkel α tritt im Brechungswinkel β in das optisch durchlässigere Medium ein. Wird der Grenzwinkel α_g überschritten, so tritt Totalreflexion ein und der Lichtstrahl wird in das Herkunftsmedium zurückgeworfen:

$$\alpha_g = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (2.2)$$

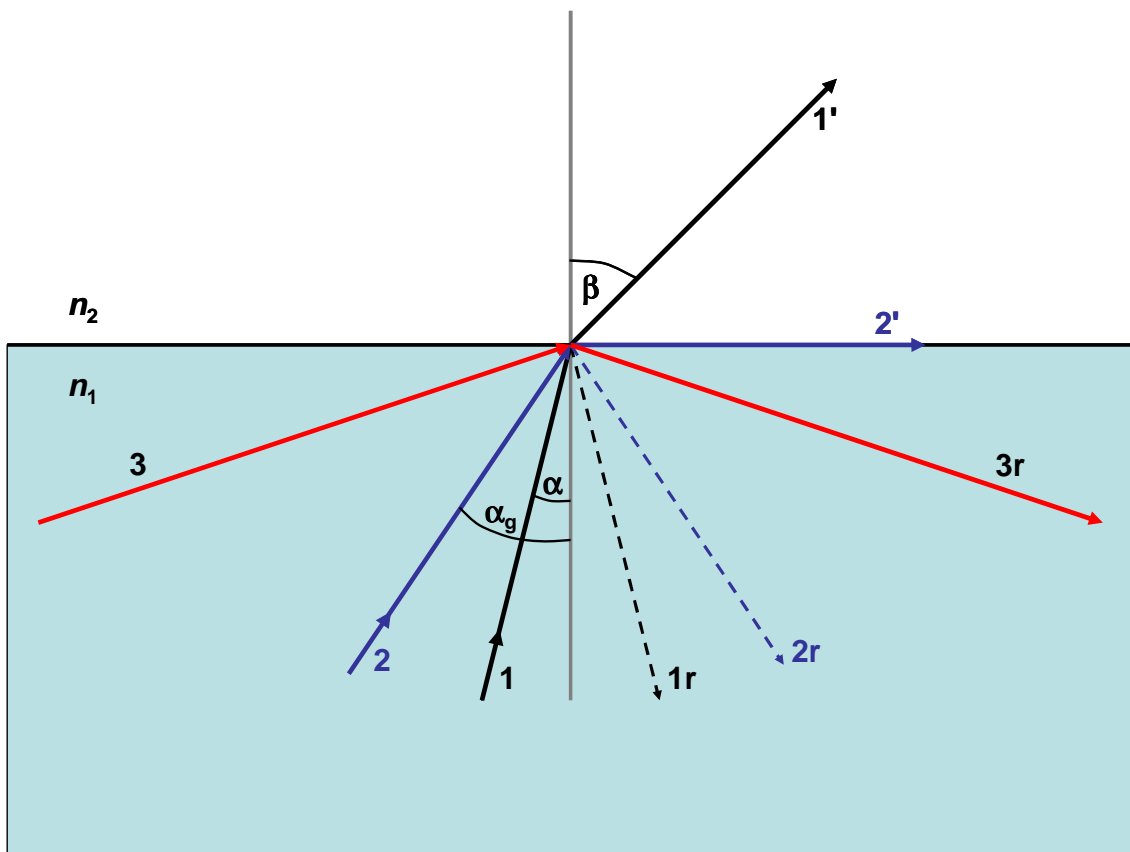


Bild 2.12: Lichtbrechung beim Übergang vom optisch dichteren ins optisch dünnere Medium ($n_1 > n_2$). Bei sukzessiver Vergrößerung des Eintrittswinkel α wächst auch der Austrittswinkel β ($\beta > \alpha$), bis er bei Erreichen des Grenzwinkel α_g schließlich $\beta = 90^\circ$ beträgt. Für den Grenzwinkel α_g zwischen streifendem Lichtausfall und Totalreflexion (Strahl 2, blau) folgt aus dem Brechungsgesetz: $\sin \alpha_g = n_2/n_1 \cdot \sin 90^\circ = n_2 / n_1$.

Da die Totalreflexion eine Beugungserscheinung ist, tritt der IR-Strahl in Form einer evaneszenten Welle in das optisch dünnere Medium ein und ein wenig versetzt wieder aus, wobei die Strahlung molekularer Absorption an der Grenzfläche unterworfen ist (Strahlversetzung D , Bild 2.13) [Goos & Hänchen, 1947; Harrick, 1960; Fahrenfort, 1961].

Die Amplitude E der evaneszenten Welle

$$E = E_0 e^{-z/d_p} \quad (2.3)$$

fällt mit zunehmendem Abstand z von der Grenzfläche exponentiell ab [Fringeli, 1992].

Die Eindringtiefe d_p der evaneszenten Welle

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi(n_1^2 \sin^2 \alpha - n_2^2)^{1/2}} \quad (2.4)$$

ist der Abstand von der Grenzfläche, bei dem das elektrische Feld auf e^{-1} des Ausgangswertes abgefallen ist. Um das Lambert-Beer'sche Gesetz auf die ATR-FTIR-Spektroskopie anwenden zu können, muss der Brechungsindex des an der Grenzschicht des ATR-Kristalls adsorbierten Films (Lipid- und/oder Proteinschicht) sowie deren Filmstärke d Berücksichtigung finden. Im Falle einer typischen Lipid-/Protein-Wechselwirkungsstudie ist die Filmstärke wesentlich kleiner als die Eindringtiefe der evaneszenten Welle ($d \ll d_p$). Die Schichtstärke des Lipidfilms kann beispielsweise durch Röntgenreflektometrie bestimmt werden. In Bild 2.13 ist der Verlauf des IR-Strahls bei Totalreflexion in Gegenwart eines dünnen (Lipid-)Films schematisch dargestellt.

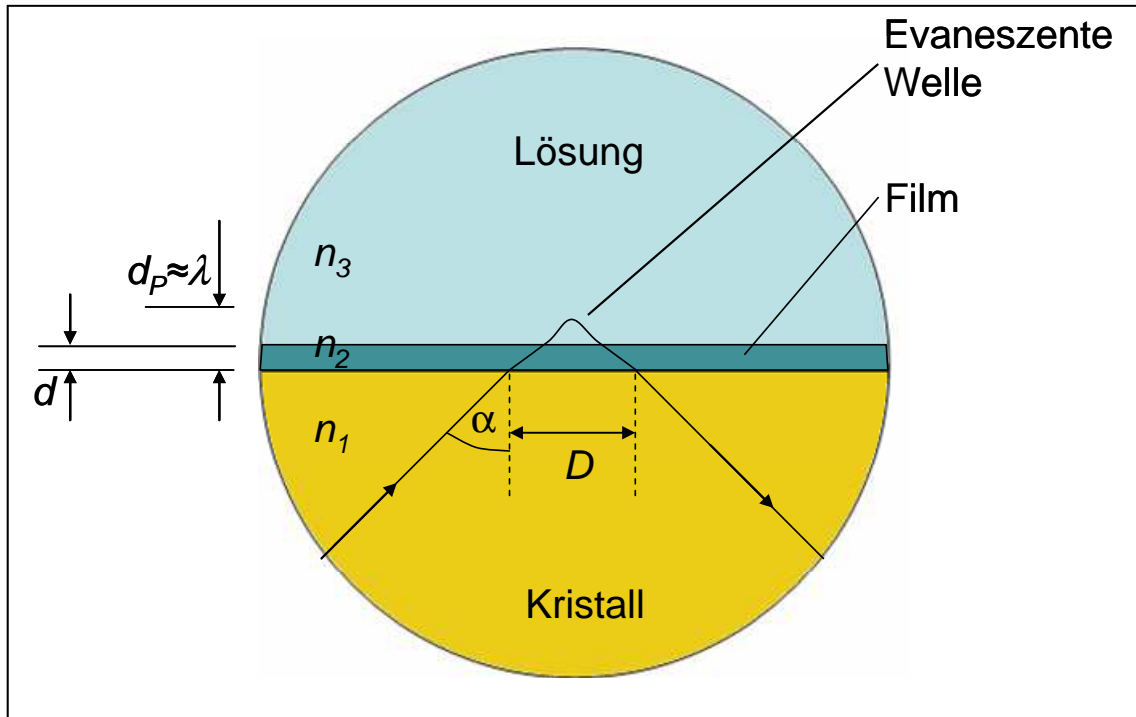


Bild 2.13: Strahlverlauf bei Totalreflexion in Anwesenheit eines dünnen Films auf der Grenzfläche. n_1 : Brechungsindex des ATR-Kristalls; n_2 : Brechungsindex des dünnen (Lipid-)Films; n_3 : Brechungsindex der wässrigen Phase; d : Dicke des (Lipid-)Films; D : Strahlversetzung.

Die effektive Eindringtiefe ist nach der Hypothese für dünne Filme [Goormaghtigh et al., 1999] für parallel und senkrecht polarisierte Anteile des einfallenden Lichtstrahls gegeben durch

$$d_{e\perp} = 4 \cdot \frac{n_{21} \cos \alpha}{(1 - n_{31}^2)} \cdot d \quad (2.5)$$

sowie

$$d_{e\parallel} = 4 \cdot \frac{n_{21} \cos \alpha [(1 + n_{32}^4) \sin^2 \alpha - n_{31}^2]}{(1 - n_{31}^2) [(1 + n_{31}^2) \sin^2 \alpha - n_{31}^2]} \cdot d \quad (2.6)$$

n_{21} bezeichnet hierbei den Quotienten n_2/n_1 der Brechungsindices n_2 (Film) und n_1 (Kristall). n_{32} ist der Quotient n_3/n_2 der Brechungsindices n_3 (wässrige Phase) und n_2 . n_{31} steht für n_3/n_1 . Für unpolarisiertes Licht ist die effektive Eindringtiefe

$$d_e = \frac{d_{e\perp} + d_{e\parallel}}{2} \quad (2.7)$$

In Bild 2.14 sind typische Werte für die Eindringtiefe d_p in Abhängigkeit der Wellenzahl und die effektive Eindringtiefe d_e in Abhängigkeit der Filmdicke für häufig

verwendete IRE-Materialien aufgetragen. Weitere Eigenschaften sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

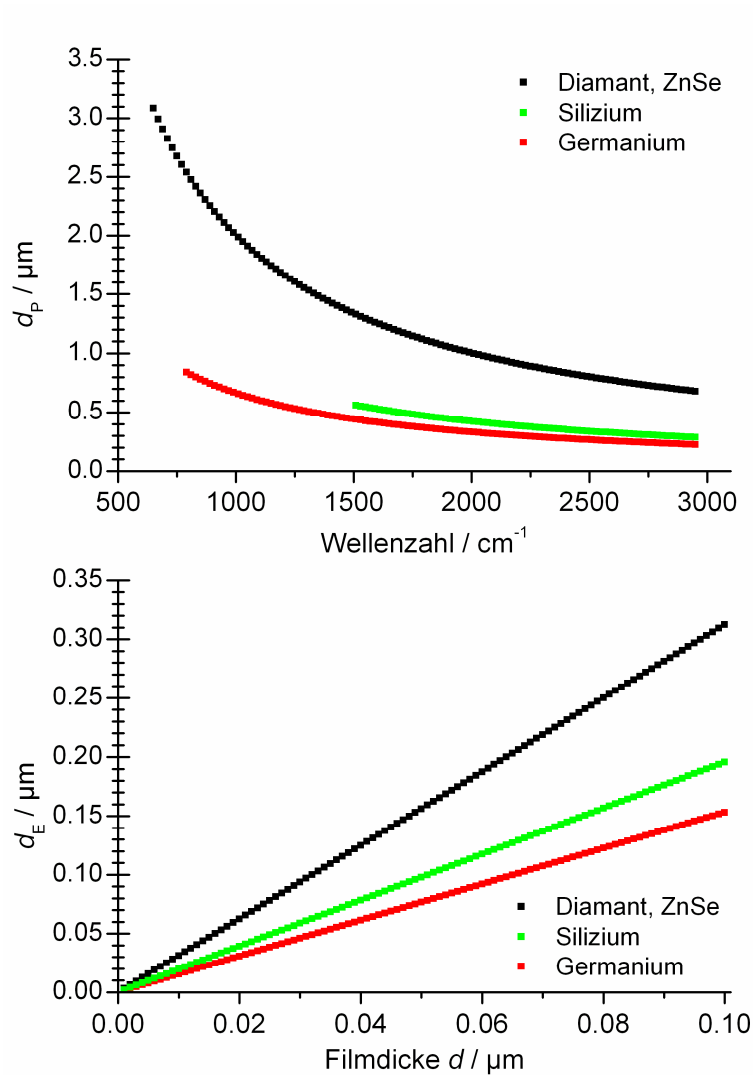


Bild 2.14: Oben: Berechnete Eindringtiefen d_p einiger IRE-Materialien in Abhängigkeit der Wellenzahl. Unten: Berechnete effektive Eindringtiefen d_e in Abhängigkeit der Filmdicke d . Es gelten die Annahmen: $\alpha = 45^\circ$; n_1 (Diamant, ZnSe) = 2,4; n_1 (Si) = 3,4; n_1 (Ge) = 4,0; n_2 (Film) = 1,5; n_3 (Solvens) = 1,33.

Tabelle 2.2: *Eigenschaften häufig verwendeter IRE-Materialien (Herstellerangaben, Fa. PikeTech).*

Kristall	Brechungs- index n_1	kritischer Winkel α_g bei $n_2 = 1,5$	spektraler Bereich / cm^{-1}	Härte nach Knoop / $\text{kg}\cdot\text{mm}^{-2}$	effektive Eindringtiefe d_e / μm bei $d = 0,05 \mu\text{m}$
Diamant	2,4	$38,7^\circ$	30.000 - 525	5.700	0,16
ZnSe	2,4	$38,7^\circ$	15.000 - 525	137	0,16
Germanium	4,0	$22,0^\circ$	5.500 - 780	550	0,08
Silizium	3,4	$26,2^\circ$	8.900 - 1.500	1.150	0,10

Die Anzahl der internen Reflexionen hängt von der Geometrie des Kristalls ab und ist im Falle eines trapezoiden IRE, der im einseitigen Kontakt mit der Probe steht (siehe Bild 2.11):

$$N = \frac{l \cos \alpha}{2d_{\text{IRE}} \sin \alpha}. \quad (2.8)$$

Die Anzahl der internen Reflexionen liegt typischerweise zwischen $N = 1$ und $N = 25$. Die effektive Weglänge

$$P_{\text{eff}} = N \cdot d_e, \quad (2.9)$$

die der Durchstrahldicke eines Transmissionsexperimentes entspricht, ergibt sich aus der Anzahl der Reflexionen und der effektiven Eindringtiefe.

3 Experimentelles

3.1 Spektrometer und ATR-Zubehör

Sämtliche Messungen wurden mit dem FTIR-Spektrometer Nicolet 6700 der Firma Thermo Electron (Dreieich, Deutschland) aufgenommen, welches ein Michelson-Interferometer als Interferenzeinheit enthält. Als Detektor wurde ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter MCT-A (Quecksilber-Cadmium-Tellur) Detektor verwendet, der nach Herstellerangaben einen Spektralbereich von 4000 cm^{-1} bis 650 cm^{-1} abdeckt. Der Spektrometer-Raum wurde kontinuierlich mit von einem Adsorptionstrockner (Zander, Essen) getrockneter Luft gespült, um das Wasser-Rauschsignal möglichst gering zu halten. Die ATR-Durchflusszelle aus Stahl der Firma Piketech (Madison, WI, USA) kann durch einen Flüssigkeitskreislauf über einen Thermostaten (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) temperiert werden. Als internes Reflexionselement (IRE) diente ein trapezoidaler Ge-Kristall (Piketech, $80 \times 10 \times 4\text{ mm}$, Einfallswinkel: $\alpha = 45^\circ$). Probeninjektion oder Pufferspülungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit einer Peristaltikpumpe (Masterflex L/S, Easy-Load 3, Barnant Co., Barrington, IL, USA) bei lediglich $1,4\text{ ml/min}$ vorgenommen, um evtl. zuvor präparierte Lipidmembranen auf dem Ge-Kristall nicht zu verletzen.

3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Rhodanin-basierten Molekülinhibitoren wurden von Dr. Bruno Bulic in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Waldmann (MPI, Dortmund) synthetisiert [Bulic et al., 2007]. ProIAPP wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Ralf Seidel (MPI Dortmund) in *E. coli* BL21(DE3) Zellen mittels Plasmid pET32_EK/LIC_ProIAPP (Spende von Prof. Dr. Aphrodite Kapurniotu, TU München) von Suman Jha exprimiert und anschließend aufgereinigt [Jha et al., 2009]. N-Ras Far/HD wurde in einem semisynthetischen Ansatz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Waldmann (MPI, Dortmund) hergestellt [Brunsveld et al., 2006]. Die Peptidinhibitoren NF(N-Me)GA(N-Me)IL und IAPP-GI wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kapurniotu (TU München) synthetisiert [Kapurniotu et al., 2002; Yan et al., 2006].

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
D ₂ O	Merck
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
NaCl	J. T. Baker B. V. (Deventer, Holland)
DCI	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck (Darmstadt)
MgCl ₂	Merck
hIAPP	Calbiochem (La Jolla, CA, USA), Lot ## B77447, B70008, D00028695
rIAPP	Spende von Prof. Dr. Kapurniotu, Center of Integrated Protein Science, TU München
IAPP-GI	Center of Integrated Protein Science, TU München

Chemikalie	Bezugsquelle
NF(N-Me)GA(N-Me)IL	Center of Integrated Protein Science, TU München
Chicago Sky Blue	Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Lacmoid	Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Rhodanin Verbindung 1	Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Rhodanin Verbindung 2	Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
proIAPP	Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Resveratrol	Sigma-Aldrich
DOPC	Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids
DPPC	Avanti Polar Lipids
Cholesterol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	Sigma-Aldrich
TFE	Merck
HFIP	Merck
N-Ras Far/HD	Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Insulin	Sigma-Aldrich
NaOD	Sigma-Aldrich

3.2.1 Verwendete Puffersysteme

Zur Untersuchung der Membranwechselwirkung der amyloidogenen Peptide, welche in den β -Zellen des Pankreas sekretiert werden (IAPP und ProIAPP) und deren Inhibitoren, wurde ein Phosphatpuffer in D_2O (10 mM Na_2HPO_4 , NaCl. Gesamtionenstärke: 100 mM) verwendet. Zur Untersuchung des Ras-Signalproteins in Wechselwirkung mit Raft-Membranen wurde ein Tris-Puffer (20 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$) in D_2O verwendet. Jeder Puffer wurde unter Verwendung von DCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.3 Vesikel- und Membranpräparation

3.3.1 Lipidmischungen

Die gewünschte Menge des gefriergetrockneten Lipids wurde in 1 ml Chloroform aufgelöst, um eine Stammlösung (10 mg/ml oder 40 mg/ml) zu erhalten. Aus den Stammlösungen wurden folgende Lipidmischungen zusammenpipettiert:

Tabelle 3.2: Herstellung von Lipidmischungen

Mischung	Verhältnis	Stammlösung je Komponente	finale Lipidmenge
DOPC	-	10 mg/ml	0,5 mg
DOPC:DOPG	7:3	10 mg/ml	0,5 mg
	8:2	10 mg/ml	0,5 mg
	9:1	10 mg/ml	0,5 mg
DOPC:DPPC:Chol	1:2:1	10 mg/ml	0,5 mg
(Raft)		40 mg/ml	20 mg

Die Lipidmischung wurde im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend über Nacht lyophilisiert, um verbliebene Chloroformreste zu beseitigen.

3.3.2 Präparation multilamellarer Vesikel (MLV)

Zu der zuvor hergestellten Lipidmischung wurde 1 ml Puffer hinzugefügt. Anschliessend wurde das Gemisch für 15 min im Ultraschallbad behandelt (bei der Raft-Mischung bei 60 °C, sonst bei 25 °C), um die Lipide zur Lösung zu bringen. Zur Homogenisierung wurde die Lipidlösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschliessend im Wasserbad wieder aufgetaut. Nach fünfmaligem Einfrieren und Wiederauftauen wurde eine homogene Lösung multilamellarer Vesikel (MLV) erhalten [Hope et al., 1986].

3.3.3 Präparation großer, unilamellarer Vesikel

Die Lösung multilamellarer Vesikel wurde in einem Extruder 11mal durch eine Polycarbonatmembran (Whatman, Porendurchmesser: 100 nm) hindurchgepresst. Es wurde eine Lösung großer, unilamellarer Vesikel erhalten [Hope et al., 1986].

3.3.4 Präparation trägergestützter Membranen

Die frisch hergestellte Lösung großer, unilamellarer Vesikel wurde in die auf 25 °C temperierte ATR-Zelle injiziert (bei der Raft-Mischung: 60 °C). Das Spreiten der Vesikel geschieht spontan [Feder et al., 1995; Rädler et al., 1995]. Im Falle der Raft-Membran wurde die Zelle anschließend auf 25 °C temperiert. Die Membran wurde anschließend für mehrere Stunden mit 2 ml Puffer gespült. Dabei wurde der Puffer von einem Reservoir in die Zelle geleitet, um, nachdem er die Zelle durchlaufen hatte, in einem Kreislauf wieder in das Reservoir zurückzufließen [Fringeli, 1992].

3.4 Probenvorbereitung

hIAPP. 0,5 mg des gefriergetrockneten hIAPP (Trifluoracetat-Salz, Peptidgehalt: 83 %) wurden in 1 ml TFE oder HFIP aufgelöst, um eine Stammlösung zu erhalten. 100 µl der Stammlösung wurden im Lyophilisator getrocknet und anschließend mit 1 ml Phosphat-Puffer aufgenommen, um eine 10 µM Lösung zu erhalten.

ProIAPP. Die gefriergetrockneten Aliquots wurden in 1 ml Puffer aufgelöst, um eine 10 µM oder 40 µM Lösung zu erhalten.

Molekül-Inhibitoren. 1 µl Stammlösung (1 mM oder 10 mM in DMSO) wurden zu 1 ml Puffer gegeben, um eine 1 µM oder 10 µM Lösung zu erhalten.

Peptid-Inhibitoren inkl. rIAPP. Die gefriergetrockneten Aliquots wurden in 1 ml Puffer aufgelöst, um eine 10 µM oder 100 µM Lösung zu erhalten.

Insulin. Insulin wurde in D₂O bei pH 3,5 aufgelöst, um eine 10 µM Lösung zu erhalten. Dann wurden NaCl und Na₂HPO₄ hinzugefügt, so dass eine 10 mM Phosphat-Lösung mit einer Gesamtionenstärke von 100 mM erhalten wurde. Anschließend wurde der pH-Wert mit NaOD auf 7,4 eingestellt.

hIAPP-Inhibitoren-Gemisch. Sollte hIAPP mit einem der Inhibitoren gemischt werden, um deren aggregationsverhindernde Eigenschaften zu bestimmen, so wurde grundsätzlich zuerst eine Lösung des Inhibitors wie oben beschrieben in Puffer hergestellt. Im Anschluss daran wurde hIAPP in der Inhibitor-Lösung aufgelöst. Das resultierende Gemisch wurde gegebenenfalls für 3 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (Stuart Tube Rotator SB2, 20 rpm, Barloworld Scientific Ltd, Staffordshire, UK) geschüttelt, um eine ausreichende Assoziation zwischen dem hIAPP und dem Inhibitor zu gewährleisten.

N-Ras Far/HD. Die zur Verfügung stehende N-Ras-Stammlösung (c = 23,4 mg/ml, gelöst in H₂O-Puffer, 20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 1 mM Dithioerythritol, pH 7,5) wurde langsam über 30 min im Eis-Wasser-Bad aufgetaut. Anschließend wurden ihr 4,3 µl entnommen und in 1 ml D₂O-Puffer (Raumtemperatur) aufgelöst, um eine 100 µg/ml Lösung zu erhalten.

3.5 Durchführung der Messungen

Vor Beginn eines jeden Experiments wurde der ATR-Kristall für 30 min mit Niederdruck-Sauerstoffplasma behandelt, um evtl. verbleibende organische Verunreinigungen zu eliminieren und die Oberfläche hydrophil zu aktivieren (Plasmacleaner Femto, Fa. Diener electronic, Nagold, Deutschland). Der frisch gereinigte Germanium-Kristall wurde in die ATR-Zelle eingebaut und mit einem O-Ring aus Viton und einer Kunststoffplatte arretiert. Anschließend wurde die Zelle vollständig zusammengebaut, auf die im IR-Probenraum installierte ATR-Spiegeloptik aufgesetzt, und der Thermostat angeschlossen. Die Temperatur wurde auf 25 °C reguliert.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Aufnahme der Spektren mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

Tabelle 3.3: Spektrometer-Einstellungen.

Spektraler Bereich:	4000 cm ⁻¹ bis 1100 cm ⁻¹
Anzahl der Scans pro Spektrum:	128
Spektrale Auflösung:	2 cm ⁻¹ (Datenpunktabstand 0,964 cm ⁻¹)
Interferometergeschwindigkeit:	2,5317 cm/s
Apodisierung:	Happ-Genzel

Vor Beginn eines jeden Experiments wurde das Spektrometer von der Software mithilfe des internen Lasers kalibriert. Die Blendenöffnung wurde dabei so gewählt, dass das Interferogramm während der Kalibrierung nicht die maximal zulässige Intensität von 9,8 überschreitet. Danach wurde ein Hintergrundspektrum aufgenommen und anschließend abgespeichert. Der Hintergrund wurde während des gesamten Experimentes verwendet.

Der Puffer wurde in die ATR-Zelle mit einer Kunststoff-Einwegspritze injiziert (1 ml), und es wurde ein Pufferspektrum als Basislinie aufgenommen. Falls nicht anders angegeben, wurden Proben von 1 ml Volumen präpariert.

3.5.1 IAPP- und ProIAPP-Experimente

hIAPP und ProIAPP ohne Gegenwart einer Lipidmembran [Jha et al., 2009]. Eine 10 μM Lösung von hIAPP oder ProIAPP wurde in die ATR-Zelle injiziert. Anschliessend wurde für hIAPP über einen Zeitraum von 20 h jede 5 min ein ATR-Spektrum aufgenommen. Für das ProIAPP wurde lediglich nach wenigen Minuten ein Spektrum aufgenommen, um dessen native Struktur bestimmen zu können.

hIAPP in Gegenwart einer DOPC-Doppelschicht [Jha et al., 2009; Evers et al., 2009]. Es wurde eine 0,5 mg/ml Lösung großer, unilamellarer DOPC-Vesikel wie in 3.3.4 bereits beschrieben in die ATR-Zelle injiziert. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 10 h jede 5 min ein ATR-Spektrum aufgenommen. Die Membran wurde über einen Zeitraum von 6 h mit 2 ml Puffer gespült (Kreislauf wie in 3.3.4). Während des Waschvorgangs wurde jede 5 min ein ATR-Spektrum aufgenommen. Zu der fertig präparierten Lipidmembran wurde eine 10 μM hIAPP-Lösung gegeben. Dann wurde über 20 h jede 5 min ein ATR-Spektrum aufgenommen.

hIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3)- Doppelschicht [Mishra et al., 2008; Jha et al., 2009]. Es wurde genauso verfahren wie bei der DOPC-Doppelschicht. Anstelle der DOPC-Mischung wurde jedoch die DOPC/DOPG (7:3)-Mischung verwendet.

hIAPP in Gegenwart einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raft-Membran [Jha et al., 2009]. Die vesikuläre Raft-Lösung (0,5 mg/ml) wurde bei 60 °C in die ATR-Zelle injiziert. Die Zelle wurde auf 25 °C abgekühlt. Anschließend wurde genauso verfahren wie bei der anionischen und der DOPC-Doppelschicht.

ProIAPP in Gegenwart einer DOPC-Doppelschicht [Jha et al., 2009]. Es wurde genauso verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der DOPC-Doppelschicht. Anstelle von hIAPP wurde jedoch eine 40 μM Lösung von proIAPP verwendet. Es wurde über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen jede 30 min ein Spektrum aufgenommen.

ProIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3)-Doppelschicht [Jha et al. 2009]. Es wurde genauso verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der anionischen Doppelschicht. Anstelle von hIAPP wurde jedoch eine 10 μM , 20 μM oder 40 μM Lösung von proIAPP verwendet. Es wurde über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen jede 30 min ein Spektrum aufgenommen.

ProIAPP in Gegenwart einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raft-Membran [Jha et al., 2009]. Es wurde genauso verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der Raft-Membran. Anstelle von hIAPP wurde jedoch eine 40 μM Lösung von proIAPP verwendet. Es wurde über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen jede 30 min ein Spektrum aufgenommen.

3.5.2 IAPP-Inhibitor-Experimente

rIAPP ohne Gegenwart einer Lipidmembran. Eine 10 μM Lösung von rIAPP wurde in die ATR-Zelle injiziert. Anschliessend wurde über einen Zeitraum von 20 h jede 5 min ein ATR-Spektrum aufgenommen.

Peptidinhibitoren in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Doppelschicht. Es wurde genauso verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der anionischen Doppelschicht. Anstelle von hIAPP wurde jedoch eine 10 μM Lösung von rIAPP, IAPP-GI, Insulin, NF(N-Me)GA(N-Me)IL oder NFGAIL verwendet.

Inhibition der hIAPP-Aggregation mit proIAPP [Jha et al., 2009]. 10 μM hIAPP wurde in 10 μM proIAPP wie in 3.4 beschrieben aufgelöst. Die Probe wurde für 4 min oder für 3 h geschüttelt. Anschliessend wurde jeweils so verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der anionischen Doppelschicht.

Inhibition der hIAPP-Aggregation mit molekularen Inhibitoren [Mishra et al., 2008; Mishra et al., 2009]. 10 μM hIAPP wurde in 1 μM oder 10 μM Rhodanin-Verbindung **1**, 1 μM oder 10 μM Rhodanin Verbindung **2**, 10 μM Lacmoid oder 10 μM Chicago Sky Blue wie in 3.4 beschrieben aufgelöst. Anschliessend wurde jeweils so verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der anionischen Doppelschicht.

Inhibition der IAPP-Aggregation mit Resveratrol ohne Gegenwart einer Lipidmembran. 10 μM hIAPP wurden in 10 μM Resveratrol wie in 3.4 beschrieben aufgelöst. Der Ansatz wurde für wenige Minuten oder zur Assoziat-Bildung für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschliessend wurde so verfahren wie bei hIAPP ohne Gegenwart einer Lipidmembran.

Inhibition der hIAPP-Aggregation mit Resveratrol in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3)-Doppelschicht. 10 μM hIAPP wurden in 10 μM Resveratrol wie in 3.4 beschrieben aufgelöst. Der Ansatz wurde für wenige Minuten oder zur Assoziat-Bildung für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde so verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der anionischen Doppelschicht.

Inhibition der hIAPP-Aggregation mit Peptidinhibitoren. 10 μM rIAPP, 10 μM Insulin, 10 μM IAPP-GI oder 10 μM NFGAIL-GI wurden wie in 3.4 beschrieben aufgelöst. Anschließend wurde jeweils so verfahren wie bei hIAPP in Gegenwart der anionischen Doppelschicht.

Auflösung aggregierter hIAPP-Spezies mit Molekül- oder Peptidinhibitoren. Nach Durchführung des Experimentes „hIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Doppelschicht“ wurde untersucht, ob Inhibitoren in der Lage sind, die bereits vorhandenen IAPP-Fibrillen wieder aufzulösen und damit die Aggregation rückgängig zu machen. Dazu wurden 10 μM oder 100 μM IAPP-GI oder 10 μM oder 100 μM NFGAIL-GI in die die Membran und aggregiertes hIAPP enthaltende ATR-Zelle injiziert. Anschließend wurde im Falle von 10 μM IAPP-GI und NFGAIL-GI über einen Zeitraum von 100 h jede 20 min ein Spektrum aufgenommen. Im Falle von 100 μM IAPP-GI und NFGAIL-GI wurde über einen Zeitraum von 7 d jede 30 min ein Spektrum aufgenommen.

3.5.3 N-Ras an einer trägergestützten DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raftmembran

N-Ras Far/HD in Gegenwart einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raft-Membran. Eine 100 $\mu\text{g/ml}$ Lösung von N-Ras Far/HD wurde in die die Raft-Membran enthaltende ATR-Zelle injiziert. Über einen Zeitraum von 40 h wurde jede 10 min ein Spektrum aufgenommen.

3.6 Auswertung

3.6.1 Software

Die Ansteuerung des Spektrometers und Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem Programm Omnic der Firma Thermo Electron. Der Thermostat wurde mit Easy Temp von Julabo bedient. Bearbeitung und Auswertung der Spektren wurde mit dem Programm Grams 8 (Thermo Electron) durchgeführt. Auswertung und Darstellung weiterer Daten erfolgte mit Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) oder Excel (Microsoft Corporation). Skizzen wurden mit Microsoft PowerPoint angefertigt. Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Programm Word (Microsoft) verfasst.

3.6.2 Auswertung der Spektren der Lipidmembran

Die Änderung des Lipidsignals kann während der Spreitung und des anschließenden Spülvorgangs gut anhand der Kohlenwasserstoffbanden im Bereich von $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ verfolgt werden. Die Gesamtheit der Banden, welche von den symmetrischen und antisymmetrischen CH-, CH₂-, und CH₃- Streckschwingungen im Bereich zwischen ~ 3050 und $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ verursacht werden, werden im Folgenden als „Lipidbande“ bezeichnet. Zur Auswertung wird zunächst das vor jeder Messung aufgenommene Pufferspektrum von dem Lipidspektrum subtrahiert. Danach wird eine Basislinienkorrektur unter der Lipidbande zwischen 3030 cm^{-1} und 2810 cm^{-1} durchgeführt und in diesem Bereich auf null gesetzt (Offsetkorrektur). Die Zu- oder Abnahme der Lipidmenge auf der Kristalloberfläche kann durch Integration der Lipidbande zwischen 3030 und 2810 cm^{-1} und Auftragen der Fläche unter der Lipidbande gegen die Zeit verfolgt werden.

3.6.3 Auswertung der Amid-I'-Bande des Peptids/Proteins

Wurden Protein- oder Peptiduntersuchungen ohne Gegenwart einer Lipidmembran vorgenommen, wurde das vor der Messung aufgenommene Pufferspektrum von dem Protein-/Peptidspektrum mit Faktor 1 abgezogen. Wurden Messungen in Gegenwart einer Lipidmembran vorgenommen, wurde das bei der Lipidpräparation zuletzt

aufgenommene Lipidspektrum von dem Protein-/Peptidspektrum abgezogen. Um das im Spektralbereich der Amid-I'-Bande auftretende „Wasserrauschen“ zu eliminieren, wurde ein Spektrum des Rauschens mit einem Faktor abgezogen, der von der Funktion „Autosubtract“ der GRAMS-Software bestimmt wurde. Das Programm sucht dabei selbständig nach einem Faktor, der das Rauschen in dem zu optimierenden Bereich (hier: die Amid-I'-Bande) minimal werden lässt. Im Anschluss daran wurde die Amid-I'-Bande basislinien- sowie offset-korrigiert. Um Änderungen der Intensität der Amid-I'-Bande (z.B. durch Adsorption an der Membran) zu bestimmen, wurde die Bande integriert und die Fläche unter der Amid-I'-Bande gegen die Zeit aufgetragen. Um Sekundärstrukturänderungen des Proteins/Peptids unabhängig von der adsorbierten Menge bestimmen zu können, wurde die Amid-I'-Bande normiert. Dazu wurde das Spektrum mit einem Faktor multipliziert, der dazu führt, dass der Flächeninhalt unter der Amid-I'-Bande gleich 1 cm^{-1} wird.

3.6.4 Sekundärstrukturanalyse

Um die Zusammensetzung der einzelnen Sekundärstrukturkomponenten des Peptids/Proteins annähernd bestimmen zu können, wurde unter der Annahme, dass alle Sekundärstrukturkomponenten mit dem gleichen Extinktionskoeffizienten zur Gesamtheit der Amid-I'-Bande beitragen, eine Bandenanpassung der auf einen Flächeninhalt von 1 cm^{-1} normierten Amid-I'-Bande mit Voigt-Kurven vorgenommen. Dazu wurde die Lage und Anzahl der Subbanden zunächst über die zweite Ableitung sowie mithilfe der Fourier-Selbstentfaltung (Fourier Self Deconvolution, FSD) bestimmt. Nach Festlegung der Startparameter (Lage, Anzahl und Halbwertsbreite der Subbanden) wurde die Amid-I'-Bande nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate unter Verwendung des Algorithmus von Levenberg und Marquardt als Linearkombination der Subbanden simuliert [Marquardt, 1963]. Da die Gesamtfläche unter der Amid-I'-Bande den Flächeninhalt 1 cm^{-1} zugewiesen bekommen hat, repräsentiert der Flächeninhalt einer jeden Subbande nun den Anteil der ihr zugeordneten Sekundärstruktur an der Gesamtstruktur des Proteins (siehe beispielsweise Bild 4.1 und Bild 4.2).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Sekundärstruktur von hIAPP und proIAPP

Um die Sekundärstrukturänderungen von hIAPP und proIAPP in Gegenwart von Membranen untersuchen zu können, musste zunächst festgestellt werden, welche Struktur das native Peptid in Lösung einnimmt. Da für die Aufnahme eines FTIR-Spektrums in Transmission bei einer Durchstrahldicke von $d = 50 \mu\text{m}$ Peptidkonzentrationen von mindestens $\sim 3 \text{ mg/ml}$ benötigt werden, um messbare Extinktionen zu erhalten, ist diese Methode für hochamyloidogene Peptide wie z.B. hIAPP nicht geeignet. hIAPP würde nämlich bei dieser Konzentration zu schnell aggregieren, bevor noch ein Spektrum der nativen Konformation aufgenommen werden kann. Erschwerend kommt hinzu, dass hIAPP aus technischen Gründen meistens in Salzform mit Trifluoracetat (TFA) als Gegenion erhältlich ist. Dieses Molekül absorbiert stark bei $\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ und verdeckt somit einen Teil der Amid-I'-Bande.

Bei Verwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie ist es möglich, wesentlich kleinere Peptidkonzentrationen ($\sim 0,1 \text{ mg/ml}$) zu verwenden, da sich die Konzentration lokal aufgrund von Adsorption an der Kristalloberfläche des Germanium-IRE erhöht (siehe Abschnitt 2.8). Eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ hIAPP liegt zwar immer noch oberhalb der kritischen Konzentration, die Proben werden jedoch gleich nach deren Präparation verwendet. Da es in Lösung $\sim 15 \text{ h}$ dauert, bis beim hIAPP Aggregation bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ eintritt [Hebda & Miranker, 2009], besteht hinreichend Zeit, die ATR-Messung (mit der dann wesentlich schnelleren Aggregationskinetik) zu starten. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass die TFA-Gegenionen in Lösung bleiben und somit von der evaneszenten Welle der IR-Strahlung nicht erfasst werden.

Durch die lokale Erhöhung der hIAPP-Konzentration an der Kristalloberfläche trat nach $\sim 25 \text{ min}$ zwar auch Aggregation des hIAPP ein (siehe Abschnitt 4.2), es wurden jedoch nur wenige Minuten benötigt, ein Spektrum des noch ungeordneten, quasi-nativen hIAPP aufzunehmen (Das hIAPP kann streng genommen nicht mehr nativ vorliegen, da es zumindest adsorbiert sein muss. Die Adsorption geschieht vermutlich mit dem positiv geladenen N-Terminus an die leicht negativ geladene Oxidschicht des Germaniumkristalls). Bei $10 \mu\text{M}$ ProIAPP tritt trotz lokaler Konzentrationserhöhung auch nach Wochen keine Aggregation ein [Jha et al., 2009].

In Bild 4.1 ist die Amid-I'-Bande von 10 μM hIAPP zusammen mit der aus der Bandenanpassung erhaltenen Kurve dargestellt.

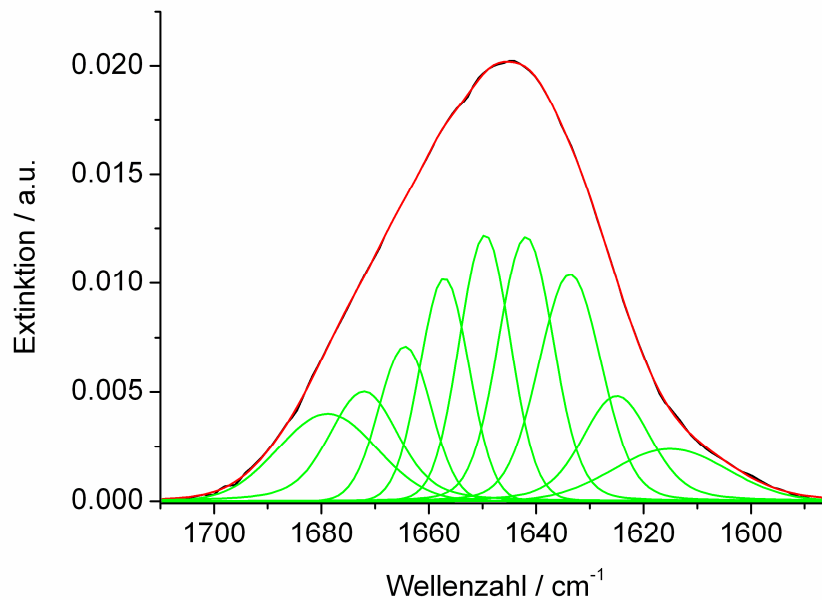


Bild 4.1: Schwarz: Amid-I'-Bande von 10 μM hIAPP nach $t = 6$ min nach der Injektion in die ATR-Zelle. Rot: Fit der Amid-I'-Bande als Linearkombination der Subbanden (grün) [Jha et al., 2009].

Jedes Spektrum wurde mehrfach mit der gleichen Anzahl an Subbanden und leichten Variationen in den Startparametern gefittet. Bild 4.2 zeigt die aus den Bandenanpassungen resultierenden Anteile der Sekundärstrukturelemente der nativen Strukturen von hIAPP und proIAPP.

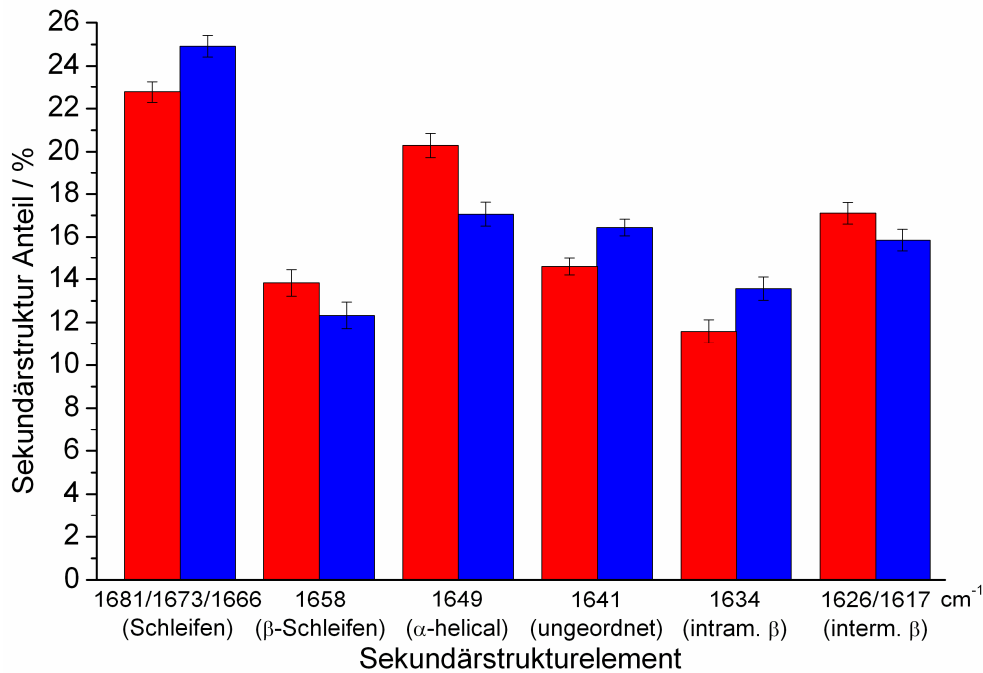


Bild 4.2: Aus Bandenanpassung ermittelte Anteile der Sekundärstrukturelemente der nativen Strukturen von hIAPP (blau) und proIAPP (rot) [Jha et al., 2009].

Beim Vergleich der Sekundärstrukturanteile von hIAPP und proIAPP muss beachtet werden, dass bei der FTIR-Spektroskopie keine absoluten Zahlen angegeben werden können, da die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Sekundärstrukturelemente nicht bekannt sind. Daher werden hier nur relative Unterschiede der Peptide zueinander betrachtet. Es fällt auf, dass proIAPP geringfügig mehr α -helicale Anteile enthält, während hIAPP etwas mehr Zufallsknäuel und Schleifen aufweist. Dass sowohl hIAPP als auch proIAPP in Lösung eine fast gleiche Sekundärstruktur aufweisen, ist auch durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie untermauert worden [Jha et al., 2009].

4.2 Aggregation von hIAPP an Membranen

Im Folgenden wurde die Aggregationsneigung von hIAPP und die damit verbundenen konformationellen Änderungen in An- und Abwesenheit verschiedener Membransysteme untersucht, darunter negativ geladene und neutrale Membranen sowie heterogene Raft-Modellmembranen. Zuletzt wurde der Effekt von proIAPP auf die Aggregationsneigung von hIAPP in Gegenwart der anionischen Lipidmembran studiert.

4.2.1 hIAPP in Abwesenheit einer Lipidmembran

Zunächst wurde die Sekundärstrukturänderung von hIAPP in Abwesenheit von Lipidmembranen untersucht. Hierzu wurden nach Injektion einer Lösung von 10 μM hIAPP in die ATR-Zelle Spektren über einen Zeitraum von 20 h in Abständen von 5 min aufgenommen. Aufgrund von Adsorption wird mit der Zeit t die lokale Konzentration an der Ge-Oberfläche erhöht und infolgedessen wird die Aggregation von hIAPP induziert.

In Bild 4.3 sind Spektren zu ausgewählten Zeitpunkten der Messung dargestellt. Während der Aggregation verschiebt sich das Maximum der Amid-I'-Bande von 1644 cm^{-1} nach 1627 cm^{-1} , was auf eine Abnahme von ungeordneten Konformationen und eine gleichzeitige Zunahme von β -Faltblättern hindeutet.

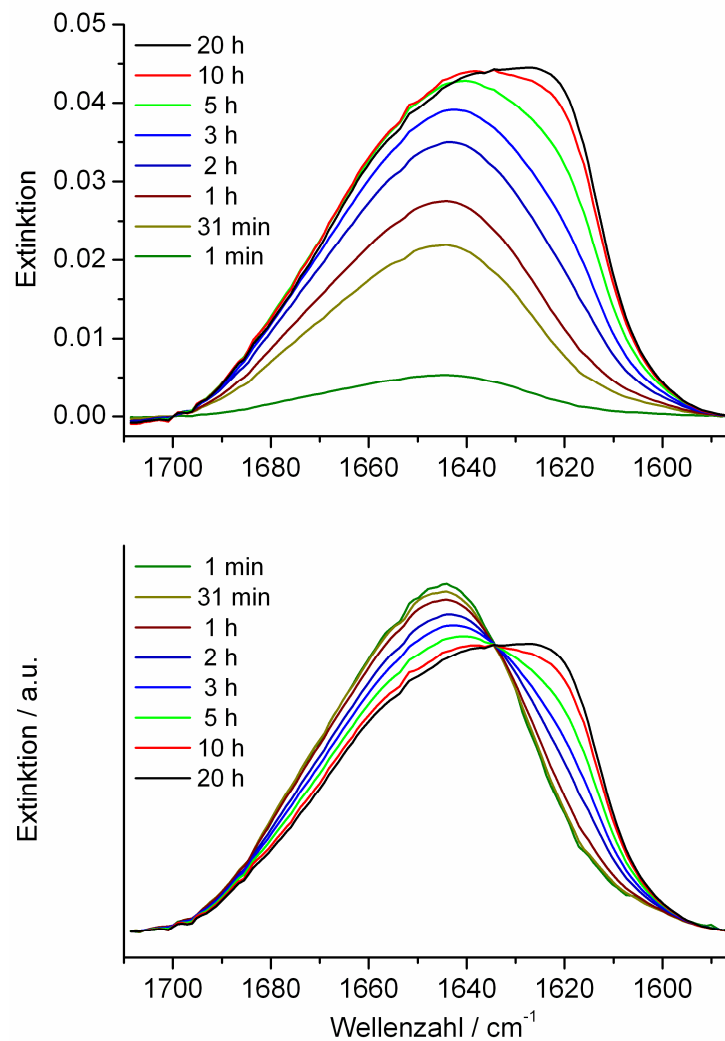


Bild 4.3: Zeitliche Änderung der Amid-I'-Bande nach Injektion von $10 \mu\text{M}$ hIAPP in die ATR-Zelle. Oben sind die Rohspektren nach Abzug eines Puffer- und eines Wasserdampfspektrums sowie Basislinienkorrektur dargestellt, unten befinden sich die flächennormierten Spektren [Jha et al., 2009].

Um die strukturelle Änderung der Amid-I'-Bande besser sichtbar zu machen, sind unten in Bild 4.3 die flächennormierten Spektren dargestellt.

Die Bandenauflösung mittels 2. Ableitung und Fourier Self Deconvolution (FSD) liefert für hIAPP bei $t = 1 \text{ min}$ Subbanden bei 1680 , 1674 , 1665 , 1658 , 1649 , 1642 und 1632 cm^{-1} sowie eine Schulter bei 1623 cm^{-1} , was auf eine komplexe Zusammensetzung verschiedener Sekundärstrukturelemente hinweist.

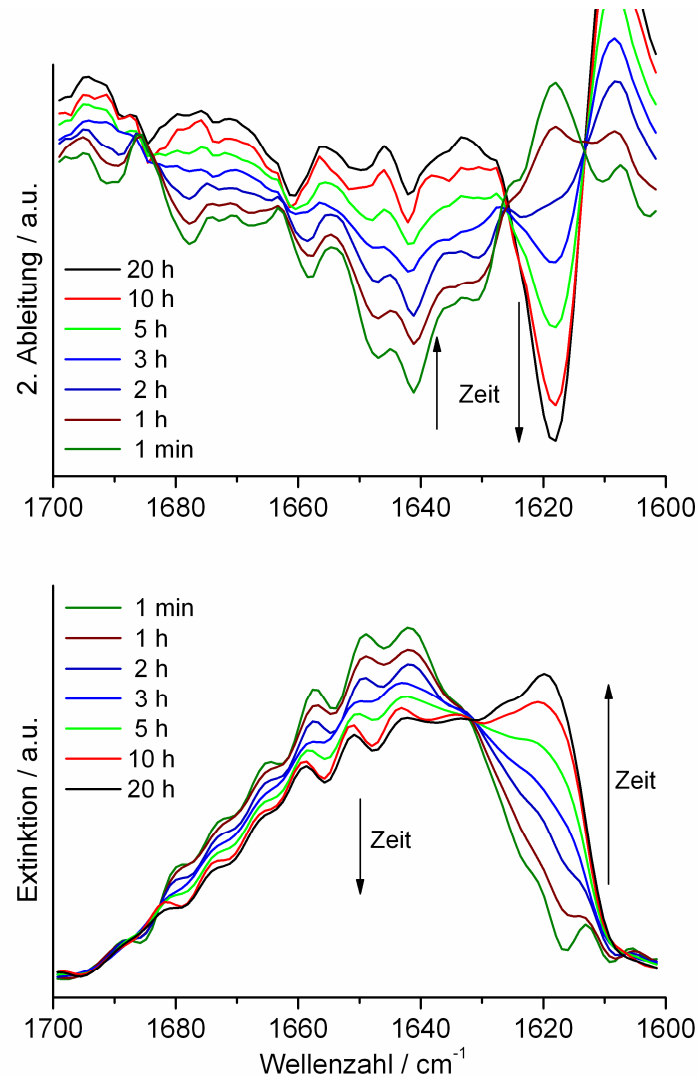


Bild 4.4: 2. Ableitung (oben) und Fourier Self Deconvolution (unten) der flächennormierten Spektren aus Bild 4.3 [Jha et al., 2009].

Während der Aggregation verschieben sich einige Subbanden in Richtung größerer Wellenzahlen und es erscheint eine breite Bande bei 1616-1619 cm^{-1} , welche einen Zuwachs an intermolekularen β -Faltblättern mit starken Wasserstoffbrücken widerspiegelt.

Um die auftretenden Sekundärstrukturänderungen quantitativ widerzugeben, wurden die normierten Banden mit neun Voigt-Subbanden gefittet. In Bild 4.5 sind die zeitlichen Änderungen der Sekundärstrukturanteile von hIAPP innerhalb der ersten 10 h dargestellt.

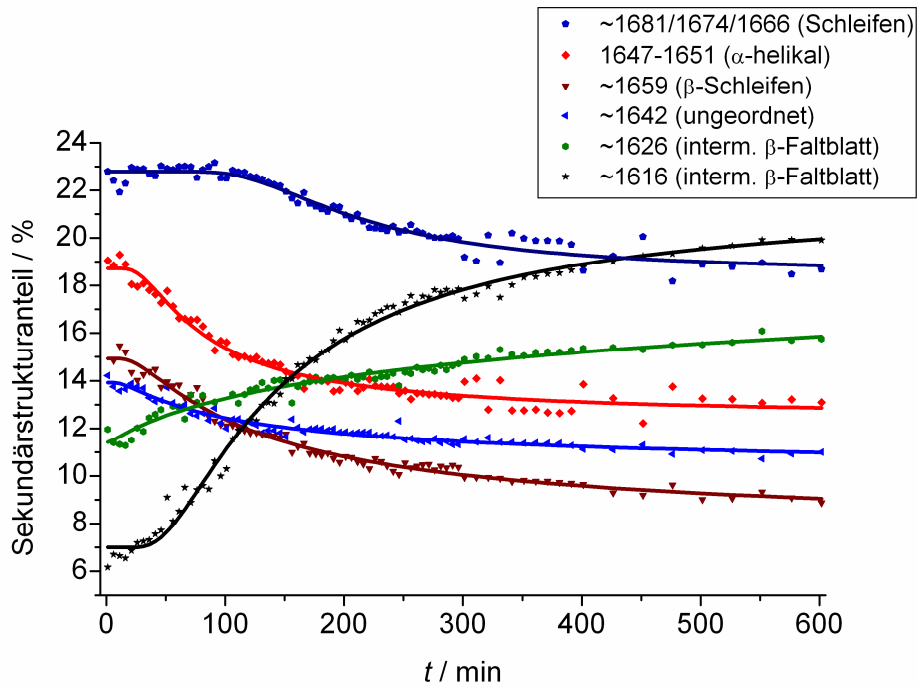


Bild 4.5: Zeitliche Änderung der Sekundärstrukturanteile von 10 µM hIAPP während der Aggregation an der Ge-Oberfläche des IRE [Jha et al., 2009].

Der Beitrag an (vermutlich parallelen) β -Faltblättern, welche von der Subbande bei 1635 cm^{-1} repräsentiert werden, ist hier nicht aufgeführt, da sich keine signifikanten Änderungen in deren Intensität von $\sim 12,5\%$ ergaben. Weiterhin lässt sich Bild 4.5 entnehmen, dass die Ausbildung von intermolekularen β -Faltblättern (Banden bei 1626 und 1616 cm^{-1}) auf Kosten von Schleifen, α -Helices und ungeordneten Strukturen stattfindet.

4.2.2 hIAPP in Gegenwart einer DOPC Doppelschicht

In einem weiteren Schritt wurde die Gegenwart einer ungeladenen (neutralen), an den Germanium-ATR-Kristall gebundenen Modellmembran auf das Aggregationsverhalten von hIAPP untersucht. Es zeigte sich, dass hIAPP zwar mit der Lipidschicht wechselwirkt, jedoch nicht vollständig zu Fibrillen aggregiert [Jha et al., 2009; Evers et al., 2009].

Bild 4.6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Amid-I'-Bande. Das Maximum der Amid-I'-Bande befindet sich bei $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$. Dies weist auf eine überwiegend ungeordnete Sekundärstruktur hin.

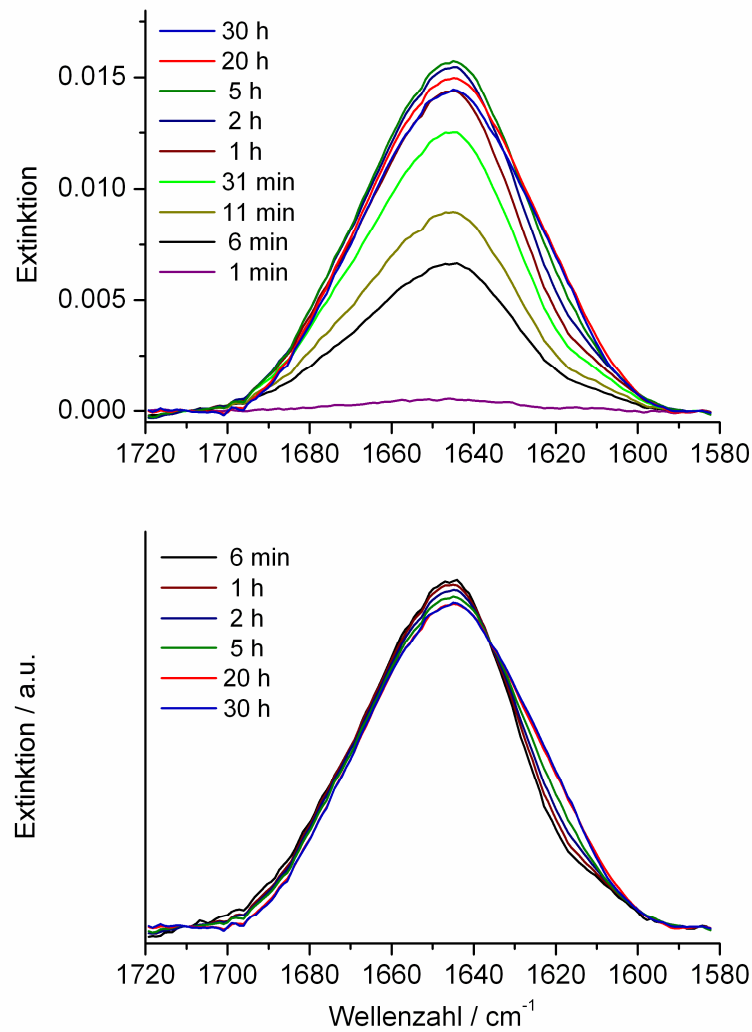


Bild 4.6: Zeitlicher Verlauf der Amid-I'-Bande von 10 μM hIAPP in Gegenwart einer DOPC-Doppelschicht. Oben: Rohspektren [Jha et al., 2009]. Unten: einige zugehörige flächennormierte Spektren.

Nach 20 h Inkubation in der ATR-Zelle lässt sich die Ausbildung einer kleinen Schulter im Bereich intermolekularer β -Faltblätter bei $\sim 1615 \text{ cm}^{-1}$ beobachten. Da nach weiteren 10 h keine signifikante Veränderung mehr festzustellen ist, lässt sich daraus schließen, dass die Reaktion hier zum Stillstand gekommen ist und sich anstatt von Fibrillen kleinere, weniger geordnete Aggregate oder möglicherweise oligomere Strukturen gebildet haben müssen.

4.2.3 hIAPP in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran

Neben der Gegenwart von Membranen spielt auch deren Ladung eine große Rolle bei der Aggregation von hIAPP. Knight und Miranker haben gezeigt, dass hIAPP stark an Membranen mit ~30 % Gehalt an anionischen Lipiden bindet [Knight & Miranker, 2004]. Dieser Zusammenhang hat eine stark erhöhte Aggregationsneigung zufolge, wenn hIAPP einer solchen Membran ausgesetzt wird. Die dabei auftretenden konformellen Änderungen wurden mittels ATR-FTIR-Spektroskopie an der anionischen, trägergebundenen Membran verfolgt [Mishra et al., 2008; Jha et al., 2009].

In Bild 4.7 oben ist die zeitliche Änderung der Amid-I'-Bande von hIAPP dargestellt, nachdem 10 μM hIAPP in die mit einer anionischen DOPC:DOPG (7:3) Lipiddoppelschicht beladenen ATR-Zelle injiziert wurde. Unten in Bild 4.7 befinden sich die entsprechenden normierten Spektren.

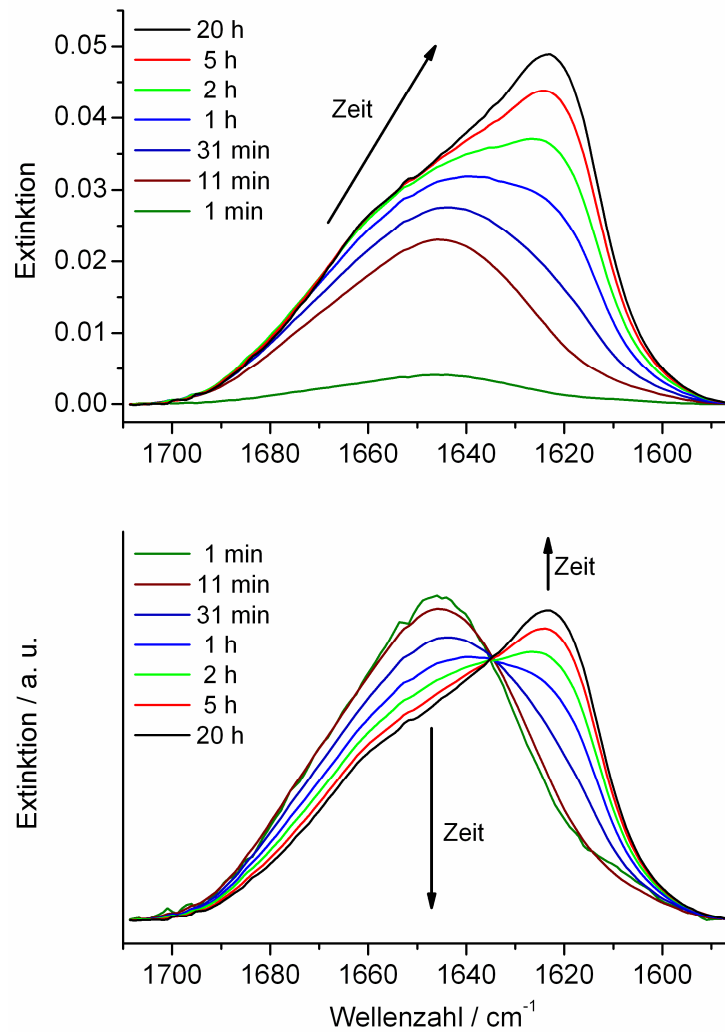


Bild 4.7: Amid-I'-Bande von 10 μM hIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Lipiddoppelschicht in Abhängigkeit der Zeit (oben). Amid-I'-Bande nach Normierung des Flächeninhaltes (unten) [Jha et al., 2009].

Das Maximum der Amid-I'-Bande verschiebt sich während der Aggregation von 1646 cm^{-1} nach 1624 cm^{-1} . Im Vergleich zu hIAPP in Abwesenheit der Lipidmembran (Bild 4.3) fällt auf, dass sowohl die Adsorption als auch die Konformationsumwandlung wesentlich schneller abläuft. Nach 2 h ist bereits eine Konformation erreicht, die in Abwesenheit der Membran nach 20 h erreicht wurde. Letztlich ist das Maximum im Bereich der intermolekularen β -Faltblätter in Gegenwart der anionischen Membran wesentlich stärker ausgeprägt. Dies zeigt, dass das Fibrillenwachstum weiter fortgeschritten ist.

Die Betrachtung der 2. Ableitung und der Fourier Self Deconvolution lässt sechs Sekundärstrukturbanden für hIAPP nach $t = 6$ min bei 1674, 1666, 1662, 1652, 1645 und 1638 cm^{-1} erkennen (Bild 4.8). Die ausgeprägteste Bande befindet sich bei 1645 cm^{-1} .

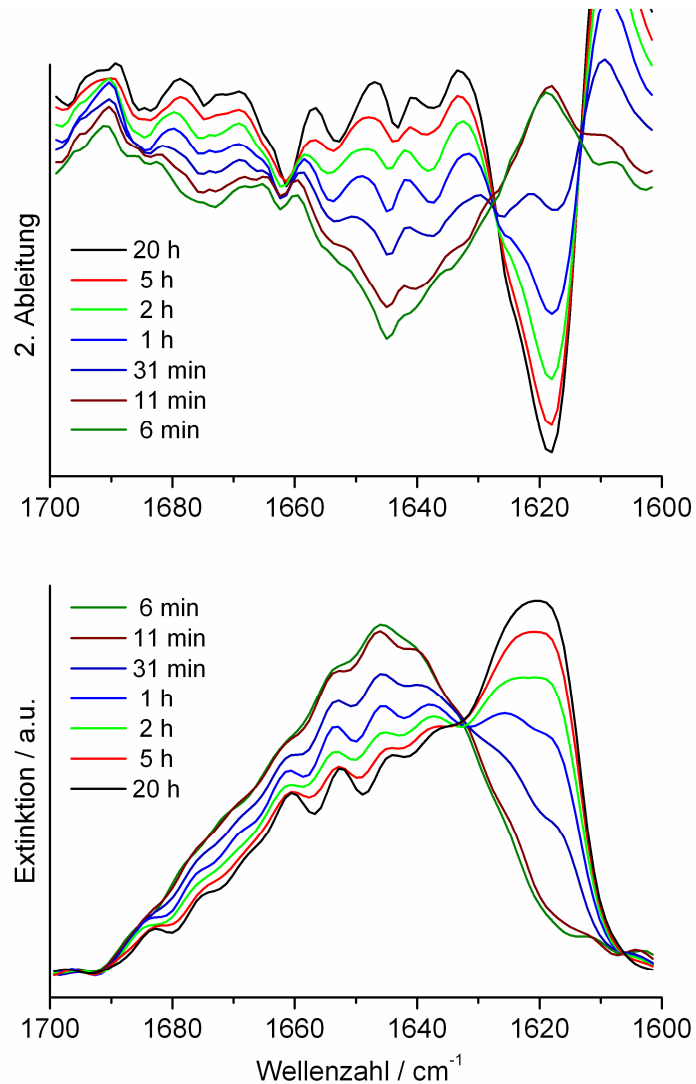


Bild 4.8: 2. Ableitung und Fourier Self Deconvolution der flächennormierten Spektren aus Bild 4.7 [Jha et al., 2009].

Im Laufe der fortschreitenden Aggregation entstehen Banden bei ~ 1684 , 1626 und 1619 cm^{-1} , wobei die beiden letzteren die Ausbildung intermolekularer β -Faltblätter deutlich machen.

Die Bandenanpassung der normierten Spektren für die ersten 5 h der Messung gibt einen quantitativen Einblick in die mit der Zeit auftretenden Änderungen in der Sekundärstruktur des Peptids (Bild 4.9).

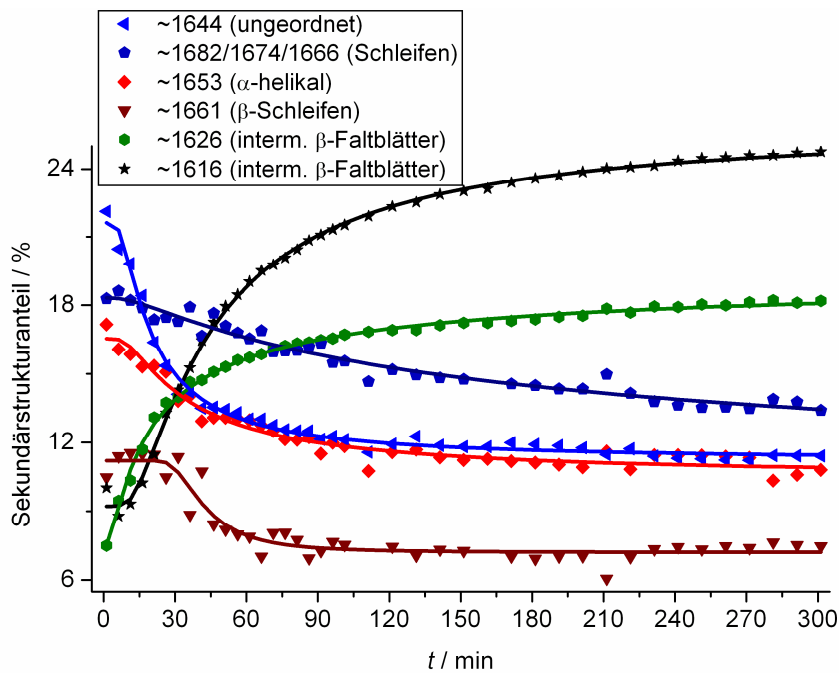


Bild 4.9: Änderungen in der Sekundärstruktur von 10 μ M hIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Doppelschicht in Abhängigkeit der Zeit [Jha et al., 2009].

Die konformationellen Änderungen verlaufen im Wesentlichen wie bei der Aggregation in Abwesenheit der Membran (Bild 4.5), jedoch in einem anderen Zeitrahmen. Es bildet sich ein größerer Anteil an intermolekularen β -Faltblättern (+5 %) auf Kosten von Schleifen aus (-5 %).

4.2.4 hIAPP in Gegenwart einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) „Raft“ Modellmembran

Während die Aggregation von hIAPP in homogenen, vor allem negativ geladenen Modellmembranen mittlerweile relativ gut untersucht wurde, gibt es nur wenige Studien über die Wechselwirkung von hIAPP mit heterogenen Raft- Modellmembranen. Es gibt jedoch Hinweise, dass Komponenten, die zur Phasenseparation beitragen, wie z.B. Cholesterol und Sphingolipide, ein allgemeiner Bestandteil von humanen extrazellulären Amyloidfibrillen sind [Gellermann et al., 2005]. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde hIAPP mit ATR-FTIR-Spektroskopie in Gegenwart einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Membran untersucht.

Die Spektren der untergrund- und basislinienkorrigierten (oben) sowie der normierten (unten) Amid-I'-Banden nach Injektion von 10 μM hIAPP in die mit der Lipiddoppelschicht beladenen Zelle sind in Bild 4.10 gezeigt. Die Verschiebung des Maximums von 1645 cm^{-1} nach 1624 cm^{-1} zeigt die Umwandlung von überwiegend ungeordneten Strukturen in intermolekulare β -Faltblätter während der Adsorption und gleichzeitiger Aggregation an.

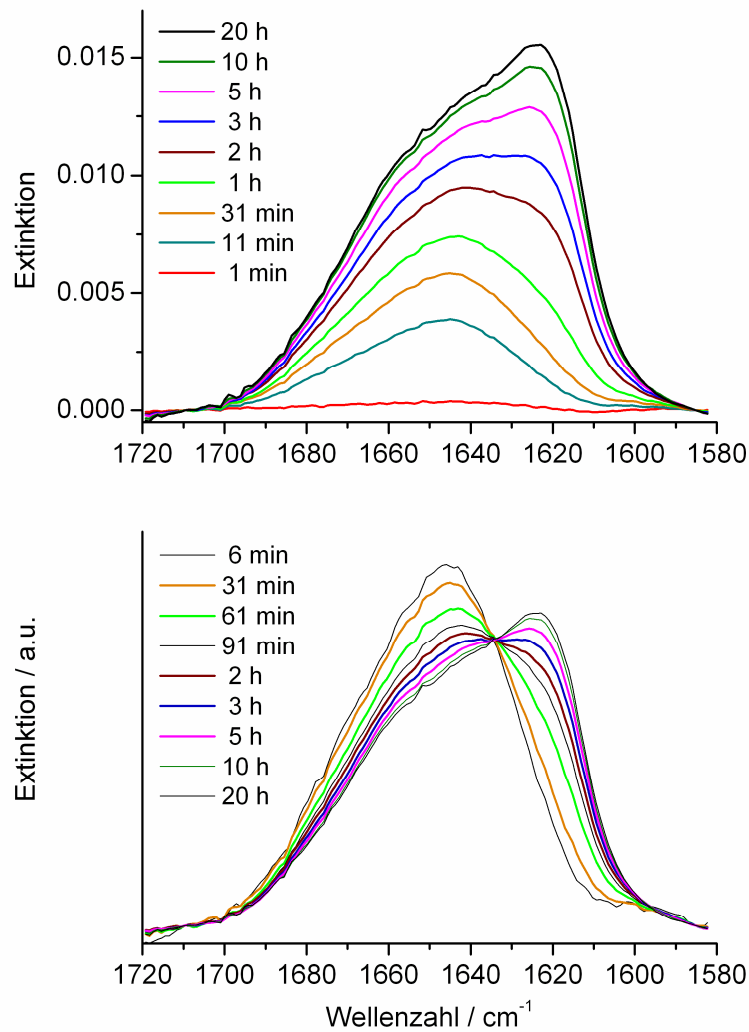


Bild 4.10: Entwicklung der Amid-I-Bande von 10 μM hIAPP in Gegenwart einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Membran (oben, [Jha et al., 2009]). Flächennormierte Spektren (unten).

Die 2. Ableitung und Fourier Self Deconvolution der normierten Spektren liefert unterscheidbare Banden bei 1682/1673/1665, 1659, 1649, 1642 und 1635 cm^{-1} , mit den ausgeprägtesten Banden bei 1642 und 1649 cm^{-1} (Bild 4.11).

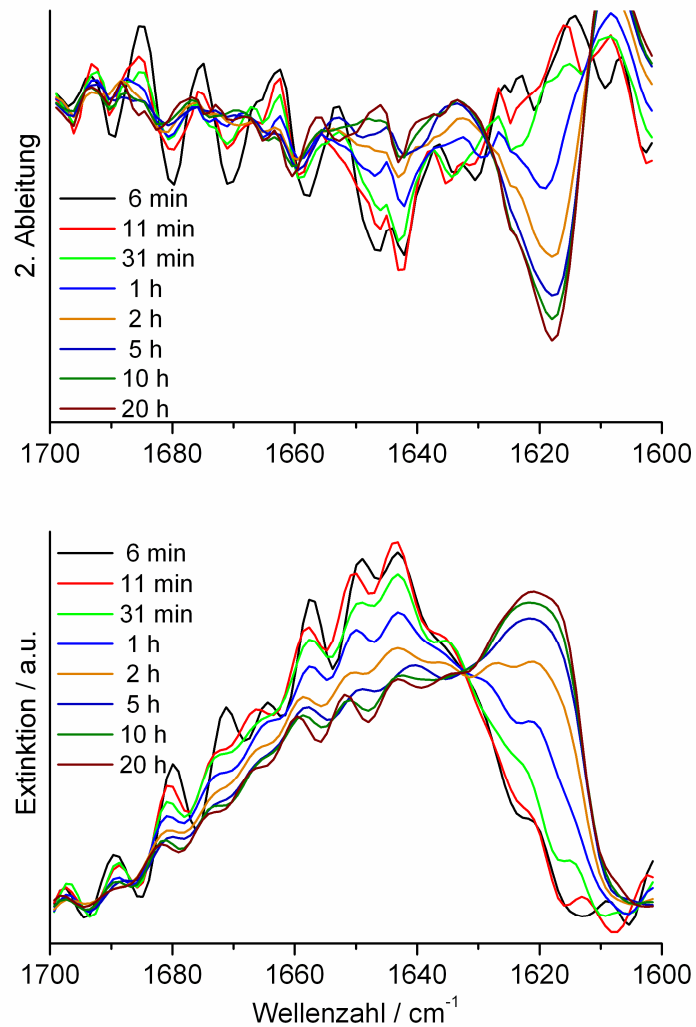


Bild 4.11: 2. Ableitung und Fourier Self Deconvolution der flächennormierten Spektren aus Bild 4.10.

Unter der vereinfachten Annahme, dass die Übergangsdipolmomente der unterschiedlichen Konformere gleich sind, lässt sich aus der Bandenanpassung der Amid-I'-Bande eine Anfangspopulation von ungefähr 40 % Schleifen, 17 % α -Helices, 28 % β -Faltblättern und 15 % ungeordneten Konformationen ermitteln (Bild 4.12).

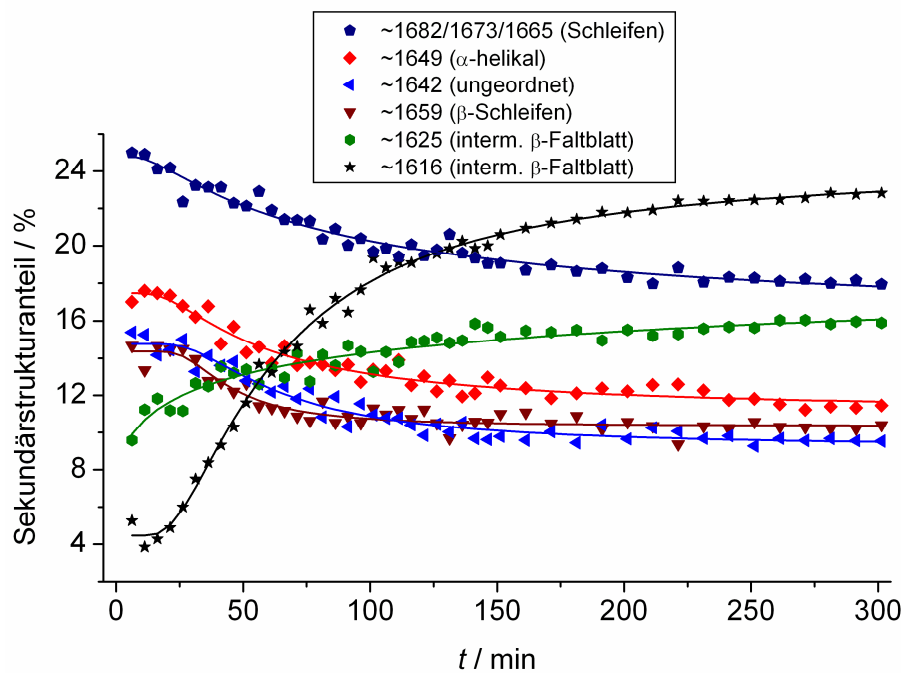


Bild 4.12: Aus Bandenanpassung ermittelte Konformationsanteile von hIAPP in Anwesenheit einer Raftmembran zu ausgewählten Zeitpunkten.

Der Anteil von α -Helices zu Beginn der Aggregation würde einen schon früher vorgeschlagenen Mechanismus untermauern, bei dem die Konformationsumwandlung von hIAPP in der Gegenwart von Membranen über α -helikale Konformationen verläuft [Knight & Miranker, 2004; Apostolidou et al., 2008; Jayasinghe & Langen, 2005]. Durch den Aggregationsprozess erscheinen Banden bei ~ 1625 und 1616 cm^{-1} , welche auf Vorliegen von intermolekularen β -Faltblättern mit starken Wasserstoffbrücken rückschließen lassen (~ 41 % nach $t = 300$ min). Die Ausbildung der β -Faltblätter geschieht auf Kosten von Schleifen, α -Helices, und ungeordneten Strukturen. Die Aggregationskinetik ist gegenüber der von hIAPP an der anionischen Lipiddoppelschicht nur geringfügig langsamer, jedoch wird ein um ~ 60 % geringerer Anteil an Aggregatstrukturen erhalten. Es darf spekuliert werden, dass die anfangs am Rand der Lipiddomänen adsorbierten hIAPP-Moleküle als Nukleationsplätze dienen. Die durch Peptidinsertion verminderte Grenzlinienspannung zwischen benachbarten Domänen könnte diesen Prozess begünstigen.

4.2.5 Einfluss von proIAPP auf die Aggregation von hIAPP

Um herauszufinden, wie proIAPP die Amyloidogenizität von hIAPP beeinflusst, wurden eine Mischung aus $10 \mu\text{M}$ hIAPP und $10 \mu\text{M}$ proIAPP, die für 3 h bei

Raumtemperatur im Überkopfschüttler geschüttelt wurde, sowie eine Mischung, die nur für 4 min geschüttelt wurde (Vortexer) in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran untersucht. Über einen Zeitraum von 96 h wurde jede 30 min ein Spektrum aufgenommen. Spektren der ersten 20 h der Messungen sind in Bild 4.13 dargestellt.

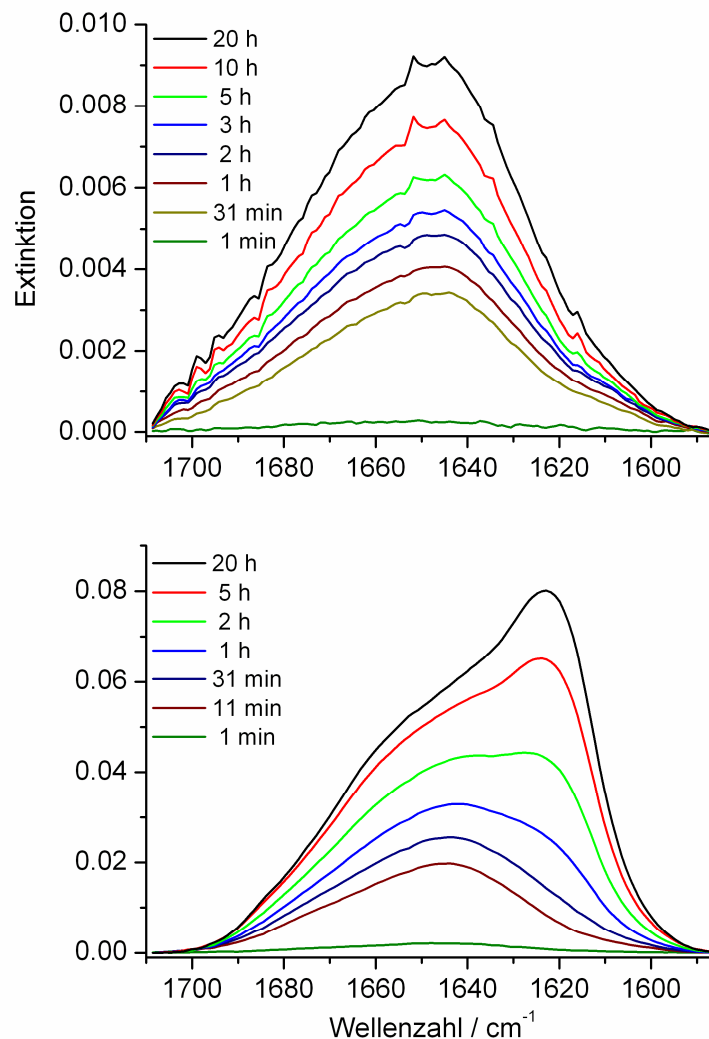


Bild 4.13: Zeitlicher Verlauf der ATR-FTIR-Spektren einer 1:1 Mischung von hIAPP und proIAPP (je 10 μM), nachdem die Probe für 3 h (oben) oder für 4 min (unten) geschüttelt und anschließend in die eine DOPC/DOPG (7:3) Lipiddoppelschicht enthaltende ATR-Zelle injiziert wurde [Jha et al., 2009].

Bei der Mischung, die über 3 h geschüttelt wurde, konnte innerhalb der 96 h Messzeit keine Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande beobachtet werden. Die Spektren zeigen jedoch eine äußerst geringe Gesamtintensität (Bild 4.13, oben). Ein unter den gleichen Bedingungen durchgeführter ThT Assay zeigte jedoch bereits zu

Beginn einen ausgeprägten Emissionspeak bei 482 nm, was bedeutet, dass bereits eine Aggregation in Lösung während der 3 h Mischzeit stattgefunden haben muss [Jha et al., 2009]. Auch die ThT Assays für Peptidmischungen von hIAPP:proIAPP im Verhältnis 1:1 und 1:3 bei einer Mischzeit von nur 4 min offenbarten eine Aggregation, jedoch mit einer im Vergleich zu hIAPP um den Faktor ~ 3 verlängerten Nukleationsphase. Dieser Befund zeigte sich auch bei der entsprechenden ATR-FTIR-Messung (Bild 4.13, unten). Die Ausbildung intermolekularer β -Faltblätter ist im Vergleich zu reinem hIAPP in Gegenwart der anionischen Membran leicht verlangsamt.

Für einen direkten Vergleich der Adsorptions- und Fibrillationskinetiken von hIAPP und der hIAPP/proIAPP (1:1) Mischung wurde die Fläche der Amid-I'-Bande durch Integration von 1710 bis 1585 cm^{-1} gegen die Zeit aufgetragen, sowie der Anteil an intermolekularen β -Faltblättern unter Berücksichtigung der (nichtnormierten) Amid-I'-Gesamtfläche (Bild 4.14).

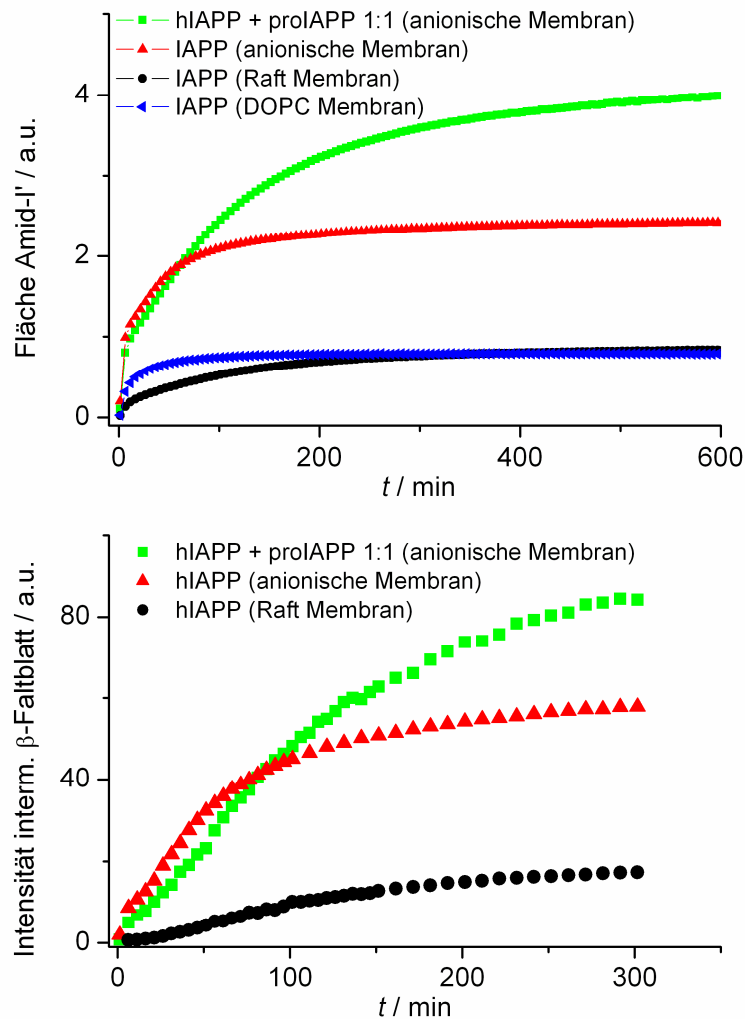


Bild 4.14: Oben: Adsorptionskinetiken von einer 1:1 Mischung aus hIAPP und proIAPP in Gegenwart einer anionischen Membran (grün) und von hIAPP in Gegenwart der anionischen Membran (rot), der DOPC:DPPC:Chol (1:2:1) Membran (schwarz) sowie der DOPC Membran (blau). Unten: β -Faltblattanteil unter Berücksichtigung der Amid-I'-Fläche [Jha et al., 2009].

Die Adsorptionskinetik von hIAPP an der anionischen Membran ist geringfügig schneller als die der hIAPP-proIAPP-Mischung, was genauso für die Fibrillationskinetik gilt. Die endgültigen Adsorptions- wie auch Fibrillationsintensitäten sind für hIAPP geringer als für die Peptidmischung, was vermutlich auf eine keiminduzierte Kofibrillation des proIAPP zurückzuführen ist. Die verlängerte Nukleations- und Elongationsphase der hIAPP-proIAPP-Mischung könnte durch Wechselwirkung und Komplexbildung zwischen dem hochamyloidogenen hIAPP-Kern und bestimmten Regionen des proIAPP, wie z.B. der pro-Region, zustande kommen.

4.3 Aggregation von proIAPP

In diesem Abschnitt wurden dieselben Membransysteme wie in Abschnitt 4.2 auf das Peptid proIAPP angewandt, um die zugrundeliegenden Mechanismen der Aggregations- bzw. Fibrillationsreaktion der Peptide hIAPP und proIAPP in Gegenwart dieser Membranen vergleichen zu können.

4.3.1 ProIAPP in Gegenwart einer homogenen DOPC- und einer heterogenen DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raftmembran

Vergleiche von teilprozessiertem und vollständigem proIAPP haben gezeigt, dass die Aggregationsneigung mit steigender Anzahl von geladenen Resten, die dem amyloidogenen Kern von hIAPP direkt benachbart sind, abnimmt [Yonemoto et al., 2008]. Aus diesem Grund besitzt proIAPP eine wesentlich geringere Amyloidogenizität, als hIAPP. Die ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen haben ergeben, dass 10 μM proIAPP weder in Gegenwart der ungeladenen oder negativ geladenen noch in Anwesenheit der heterogenen Raftmembran aggregieren [Jha et al., 2009]. Um überhaupt eine Aggregation herbeizuführen, wurden 40 μM proIAPP benötigt, und selbst dann trat vollständige Aggregation nur in Gegenwart der schon aus den hIAPP-Untersuchungen in Abschnitt 4.2 als stark amyloidogen charakterisierten anionischen Phosphoglyceridmembran auf.

Bild 4.15 zeigt ATR-FTIR-Banden der Amid-I'-Region von 40 μM proIAPP in Gegenwart einer DOPC- und einer Raftmembran.

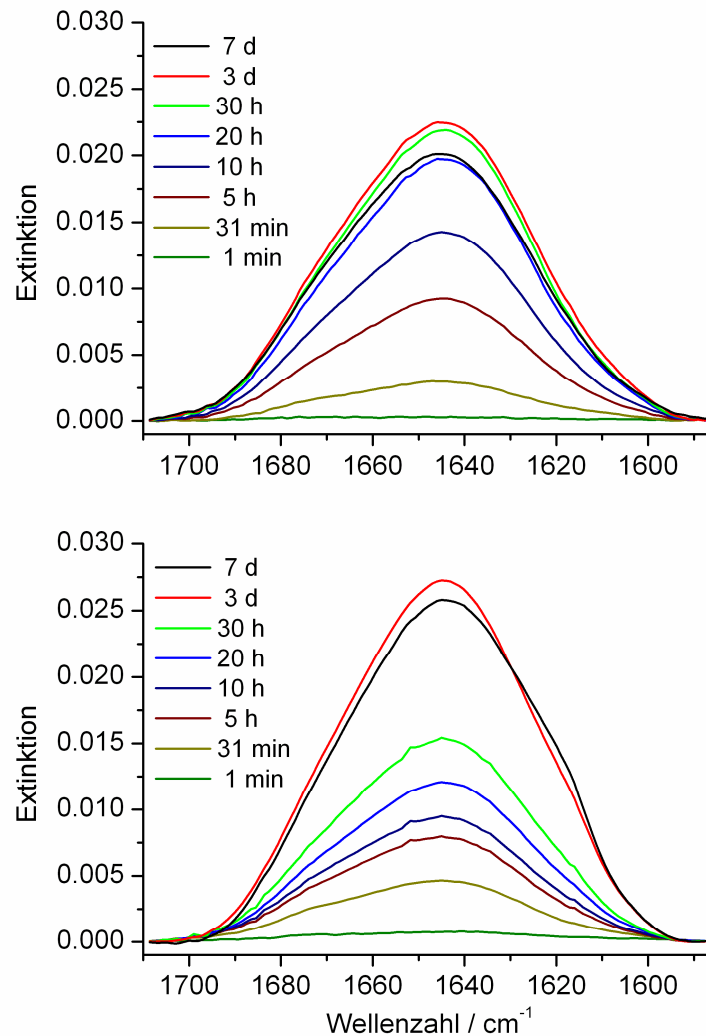


Bild 4.15: Amid-I'-Bande von 40 μM proIAPP in Gegenwart einer DOPC-Membran (oben) und einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Membran (unten) [Jha et al., 2009].

Bild 4.15, oben lässt sich entnehmen, dass 40 μM proIAPP in Gegenwart einer DOPC-Membran keine signifikanten Sekundärstrukturänderungen erfährt, da sich das Wellenzahlmaximum und die Form der Amid-I'-Bande nicht ändern. In Gegenwart der DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Lipiddoppelschicht (Bild 4.15, unten) bildet die Amid-I'-Bande erst nach 3 Tagen eine Schulter im Bereich der intermolekularen β -Faltblätter aus, welche sich nach 7 Tagen nur geringfügig weiterentwickelt hat. Daher scheint proIAPP in Anwesenheit einer heterogenen Raftmembran in einem geringen Ausmaß zu

aggregieren, jedoch ist die Umwandlung sehr langsam und die Aggregate scheinen nicht besonders geordnet vorzuliegen.

4.3.2 ProIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Lipidmembran

Die Aggregation von 40 μM proIAPP während der Adsorption an eine anionische Membran ist in Bild 4.16 zu erkennen.

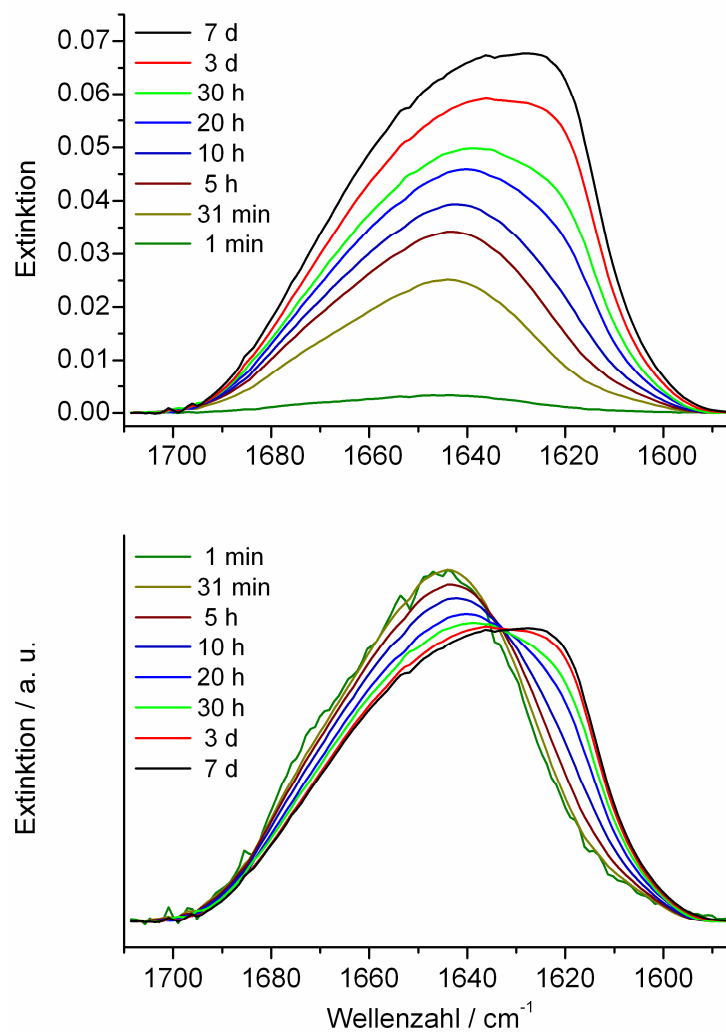


Bild 4.16: Entwicklung der Amid-I'-Bande von 40 μM proIAPP während Adsorption an eine anionische DOPC/DOPG (7:3) Lipiddoppelschicht (oben). Zugehörige normierte Spektren (unten) [Jha et al., 2009].

Das Maximum der Amid-I'-Bande verschiebt sich während des Aggregationsvorgangs von 1644 cm^{-1} nach 1628 cm^{-1} und bestätigt damit die Ausbildung intermolekularer β -Faltblätter.

Genauere Betrachtung der Daten nach 2. Ableitung und Fourier Self Deconvolution lässt sieben unterscheidbare Banden für das native proIAPP bei 1678 , 1674 , 1665 , 1657 , 1647 , 1641 und 1631 cm^{-1} erkennen (Bild 4.17). Zur besseren Visualisierung wurden die Spektren in y-Richtung leicht versetzt dargestellt.

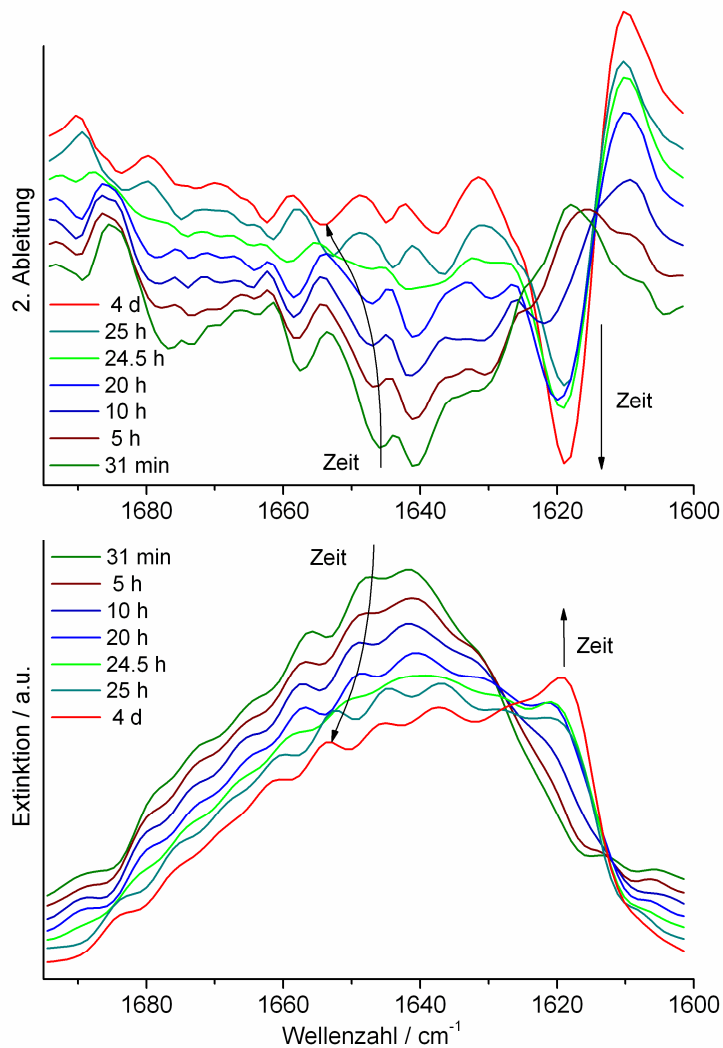


Bild 4.17: 2. Ableitung und FSD der flächennormierten Spektren von $40\text{ }\mu\text{M}$ proIAPP in Gegenwart der anionischen Membran [Jha et al., 2009].

Durch die Aggregation verschieben sich einige der Banden nach größeren Wellenzahlen hin. Außerdem erscheinen zwei ausgeprägte Banden bei ~ 1628 und 1619 cm^{-1} . In Bild 4.17 verdeutlichen die Pfeile jeweils auf der linken Seite die starke Verschiebung der Subbande bei $\sim 1647\text{ cm}^{-1}$, welche einer α -helikalen Konformation zuzuordnen ist.

Für eine quantitative Analyse der zugrundeliegenden Sekundärstrukturänderungen wurde eine Bandenanpassung der normierten Amid-I'-Bande zu ausgewählten Zeitpunkten vorgenommen. In Bild 4.18 ist die zeitliche Änderung der Konformationen innerhalb der ersten 40 h abgebildet.

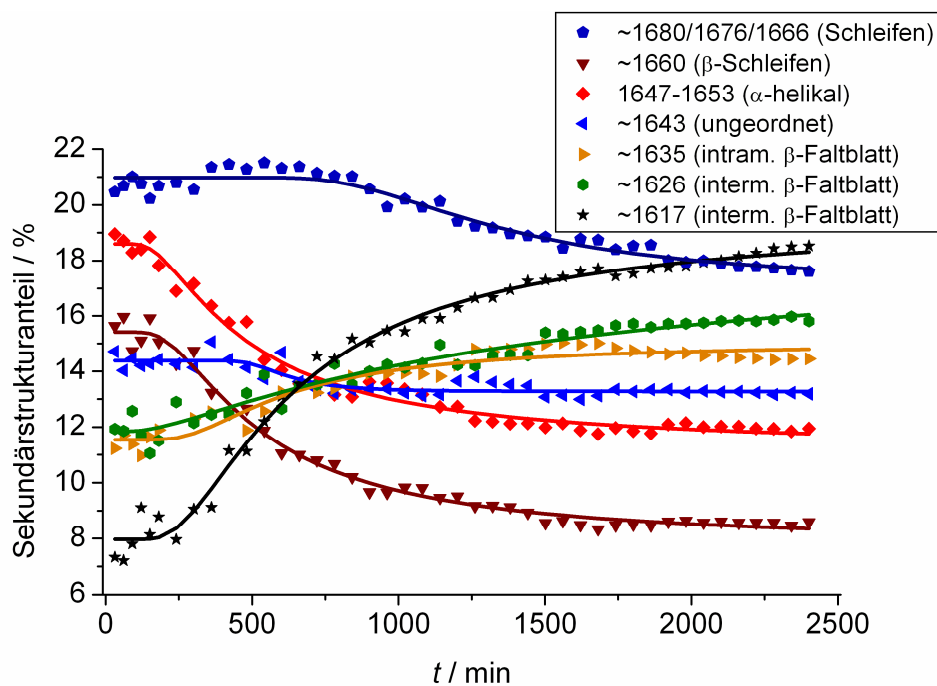


Bild 4.18: Zeitliche Änderung der Sekundärstrukturanteile bei der Aggregation von $40\text{ }\mu\text{M}$ proIAPP in Gegenwart der anionischen DOPC/DOPG (7:3) Membran [Jha et al., 2009].

Abgesehen vom unterschiedlichen Zeitrahmen verläuft die Aggregation von proIAPP an der Lipidgrenzfläche ähnlich wie die von hIAPP ohne Lipidgrenzfläche (Abschnitt 4.2.1, Bild 4.5). Lediglich die Subbande bei $\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$, die vermutlich von intramolekularen β -Faltblättern herrührt, ändert sich geringfügig von 12 % auf 14 % und wurde daher in Bild 4.18 in orange dargestellt. Die Struktur der Aggregate von membrangebundenem hIAPP (Abschnitt 4.2.3, Bild 4.9) weist wenige Prozent weniger Schleifen und etwas mehr intermolekulare β -Faltblätter auf. Für die verminderte Amyloidogenizität sind vermutlich zwei Gründe verantwortlich: Erstens die erhöhte Ladungsdichte (siehe proIAPP-Bild 2.5) und zweitens die aufeinander folgenden Ladungen des gegenüber hIAPP verlängerten C-Terminus, welche dem amyloiden hIAPP-Kern direkt benachbart sind [Yonemoto et al., 2008].

Die unterschiedlichen Sekundärstrukturanteile der an der Membran aggregierten Spezies von hIAPP und proIAPP spiegeln sich auch in den verschiedenen Morphologien wider, wie anhand von rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen gezeigt wurde [Jha et al., 2009]. Im Gegensatz zu hIAPP bildet proIAPP hauptsächlich kleine oligomerartige, nicht geordnete Strukturen an der anionischen Lipidmembran, welche eine Höhe von $\sim 3,5 \text{ nm}$ besitzen. Diese Höhe korrespondiert mit der Höhe von normalen Fibrillen, welche typischerweise zwischen 2 nm (im Falle von hIAPP-Fragmenten [Kayed et al., 1999] und α -Synuclein [Apetri et al., 2006]) und 6 nm (z.B. bei hIAPP [Marek et al., 2007] und Insulin [Jansen et al., 2005]) variiert. Die unterschiedliche Morphologie von proIAPP könnte durch die zusätzlichen pro-Regionen (also die zusätzlichen N- und C-terminalen Flanken im Vergleich zu hIAPP) zustande kommen, da effizientes Packen des Moleküls in geordnete Strukturen dadurch möglicherweise behindert wird. Eine der möglichen Funktionen der N- und C-terminalen Bereiche des proIAPP könnte also die Vermeidung der Aggregation in frühen Stadien der hIAPP-Biosynthese und während des Transportes über die sekretorischen Pfade sein [Yonemoto et al., 2008]. Es wurde auch vorgeschlagen, dass die Fibrillbildung von proIAPP und teilprozessiertem proIAPP durch Membranen sogar inhibiert wird, während die von hIAPP beschleunigt wird [Khemtémourian et al., 2009]. ProIAPP oder teilprozessiertes proIAPP ist jedoch wahrscheinlich nicht gänzlich von der frühzeitigen, intrazellulären Amyloidbildung ausgenommen [Paulsson et al., 2006; Krampert et al., 2000]. Z. B. haben verschiedene Studien gezeigt, dass proIAPP mit Heparansulfat-Proteoglykanen in Wechselwirkung tritt, wodurch Aggregationskeime für die Amyloidbildung entstehen [Park & Verchere, 2001; Meng et al., 2007]. Auch eine falsche Prozessierung des proIAPP *in vivo* könnte ein auslösendes Moment für die Amyloidablagerungen sein [Paulsson et al., 2006; Khemtémourian et al., 2009].

4.4 Inhibition der hIAPP-Aggregation durch Molekülinhibitoren

Die Aggregation von hIAPP in Gegenwart von Membranen wurde in den vorherigen Abschnitten eingehend untersucht. Die Entstehung von Diabetes Mellitus Typ 2 (T2DM) wird mit der Fibrillbildung von hIAPP sowohl aufgrund der Zelltoxizität durch Membranzerstörung als auch des Funktionsverlusts des hIAPP und kofibrillierter Proteine/Peptide im Pankreas ursächlich in Zusammenhang gebracht. Die Unterdrückung einer solchen Aggregation des hochamyloidalen hIAPP gilt daher als ein wichtiger möglicher Ansatz bei der Therapie von T2DM. Da wenig über die präfibrillären und fibrillären Strukturen von hIAPP und generell von amyloidalen Peptiden bekannt ist, ist es schwierig, Inhibitoren gezielt zu entwickeln. Amyloidfibrillen im Allgemeinen haben jedoch auf molekularer Ebene Grundgemeinsamkeiten, wie z.B. die cross- β -Faltblätter mit starken Wasserstoffbrücken. Daher dürften Molekülinhibitoren, die sich gegen die Fibrillbildung anderer Peptide (z.B. A β und τ , die Alzheimerpeptide) bewährt haben, auch bei der Verhinderung der Fibrillation von hIAPP von großem Nutzen sein.

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Molekülinhibitoren Resveratrol sowie zweier Rhodaninderivate auf die Fibrillbildung von hIAPP in Gegenwart der anionischen Lipidmembran untersucht. Die Strukturformeln zweier weiterer potentieller Molekülinhibitoren, Chicago Sky Blue und Lacmoid sowie ATR-FTIR-Spektren eines jeden dieser beiden Inhibitoren im Gemisch mit hIAPP in Gegenwart der anionischen Membran sind im Anhang enthalten.

4.4.1 Rhodaninhibitoren

In einer Studie über die Inhibition der τ -Aggregation wurden kürzlich zwei auf einem Rhodaningerüst basierende Inhibitoren ausgemacht, welche eine sehr geringe Zelltoxizität besitzen und daher als potentielle Inhibitor-Medikamente in Frage kommen [Bulic et al., 2007]. Es sollte nun festgestellt werden, ob diese Verbindungen auch die Aggregation von hIAPP inhibieren, welches zwar eine völlig andere Aminosäuresequenz besitzt, dessen fibrilläre Morphologie jedoch derjenigen des τ -Aggregates ähnlich ist.

In Bild 4.19 sind die ATR-FTIR-Spektren von 10 μM hIAPP und 10 μM hIAPP mit je 1 μM der Inhibitoren **1** oder **2** (Strukturformel siehe Bild 2.6) nach jeweils 20 h Inkubation an der anionischen Lipiddoppelschicht dargestellt.

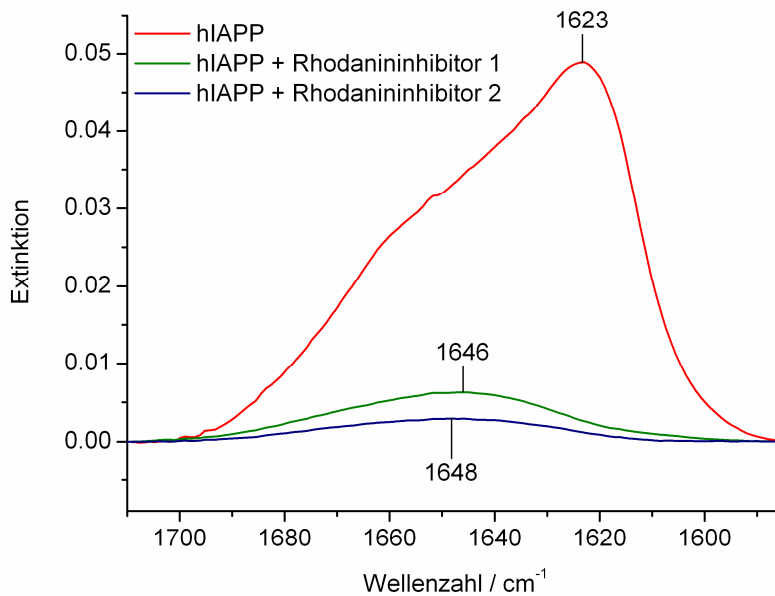


Bild 4.19: ATR-FTIR-Spektren von 10 μM hIAPP (rot), 10 μM hIAPP + 1 μM Verbindung **1** (grün) und 10 μM hIAPP + 1 μM Verbindung **2** (blau) nach 20 h Inkubation in Gegenwart der DOPC/DOPG (7:3) Lipiddoppelschicht.

In Abwesenheit des Inhibitors weist die Amid-I'-Bande des hIAPP eine hohe Intensität auf, was die hohe Affinität zur Lipidmembran anzeigt, und das Maximum bei 1623 cm^{-1} macht die Aggregation kenntlich, wie in Abschnitt 4.2.3 ausführlich behandelt wurde. Wenn dem Puffer Inhibitor zugesetzt war, ist hingegen keine Aggregationsbande sichtbar. Es erscheinen vielmehr breite IR-Banden mit niedriger Intensität bei 1646-1648 cm^{-1} , welche typisch für einen großen Beitrag an ungeordneten Konformationen monomerer und kleiner oligomerer hIAPP-Partikel in Lösung, jedoch nahe der Lipidmembran (im Eindringbereich der evaneszenten Welle) sind.

Die Effizienz der Inhibition wurde auch durch Messung der Fluoreszenzintensität des amyloidspezifisch bindenden Farbstoffs Thioflavin T mit Bezug auf die Intensität der reinen hIAPP-Aggregate ohne Inhibitor (100 %) bestimmt [Mishra et al., 2009]. Die Konzentration, bei der die Hälfte der Fibrillbildung verhindert wurde (IC_{50}), wurde für Verbindung **1** zu 1,23 μM bestimmt und zu 0,45 μM für Verbindung **2**. Aus diesen Daten lässt sich ermitteln, dass hIAPP wahrscheinlich mit Inhibitor **1** im Verhältnis 1:1

wechselwirkt, was nahelegt, dass die Inhibition zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Aggregationsprozesses stattfindet. Die nicht äquimolare Wechselwirkung, die bei Verbindung **2** beobachtet wurde, lässt vermuten, dass dieser Inhibitor eher gegen kleine Oligomere aktiv wird und diese davon abhält, reife Fibrillen zu formen. Die Wechselwirkung kommt wahrscheinlich zwischen dem heterozyklischen Ringsystem des Inhibitors und hydrophoben Stellen an der Oberfläche des monomeren oder oligomeren hIAPP zustande. Die Unterschiede der Seitenketten am Gerüst der Verbindungen **1** und **2** könnten die verschiedenen Ausmaße der Inhibition erklären, wie es zuvor im Falle des τ -Proteins diskutiert wurde [Bulic et al., 2007].

Durch AFM-Aufnahmen wurde festgestellt, dass hIAPP in Gegenwart von Verbindung **2** kleine oligomere Strukturen von 3-4 nm Größe bildet, welche in Gegenwart von Verbindung **1** nicht auftreten [Mishra et al., 2008]. Solch ein Szenario stimmt gut mit den IR-Daten überein, welche darauf hinweisen, dass der hIAPP-Inhibitor-**2**-Komplex eine signifikante Population an strukturell ungeordneten Oligomeren enthält. Ein etwas anderes Bild ergibt sich für das Szenario mit Verbindung **1**, wo nur eine sehr geringe Intensität auftritt, welche typisch für die Gegenwart von ungefalteten Monomeren in Lösung ist. Dies zeigt nochmals, dass die beiden Inhibitoren störend auf die starke, natürliche Neigung des hIAPP, sich zusammenzulagern einwirken, wenn auch mit verschiedenen spezifischen Wechselwirkungen, welche zu verschiedenen Populationen der finalen, inaktiven Spezies führen. Dieses Ergebnis ist auch ein Beispiel dafür, dass auch kleine Änderungen in der Struktur der Molekülinhibitoren zu einem unterschiedlichen Verhalten bei der Modulation der Proteinaggregation führen.

4.4.2 Resveratrol

Polyphenole sind eine Gruppe von Verbindungen, bei denen festgestellt wurde, dass sie als Inhibitoren der Fibrillbildung von A β , α -Synuclein und Prionen wirken [Porat et al., 2006]. Die Phenolverbindung Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilben), welche in signifikanten Mengen (130-220 μ M) in Rotwein zu finden ist, verhindert effektiv die Fibrillbildung von A β (25-35) und reduziert den sekretierten und intrazellulären A β -Spiegel [Marambaud et al., 2005]. Da hIAPP und A β ähnliche Aminosäuresequenzen in der vermutlich geordneten Region aufweisen und zudem gleiche Sekundärstrukturen im fibrillierten Zustand besitzen [Jayasinghe & Langen, 2004], darf ein ähnlicher inhibierender Effekt von Resveratrol auf die hIAPP-Fibrillbildung erwartet werden.

Der inhibierende Effekt von Resveratrol auf die Fibrillbildung von hIAPP in An- und Abwesenheit einer anionischen Lipidmembran ist in Bild 4.20 dargestellt.

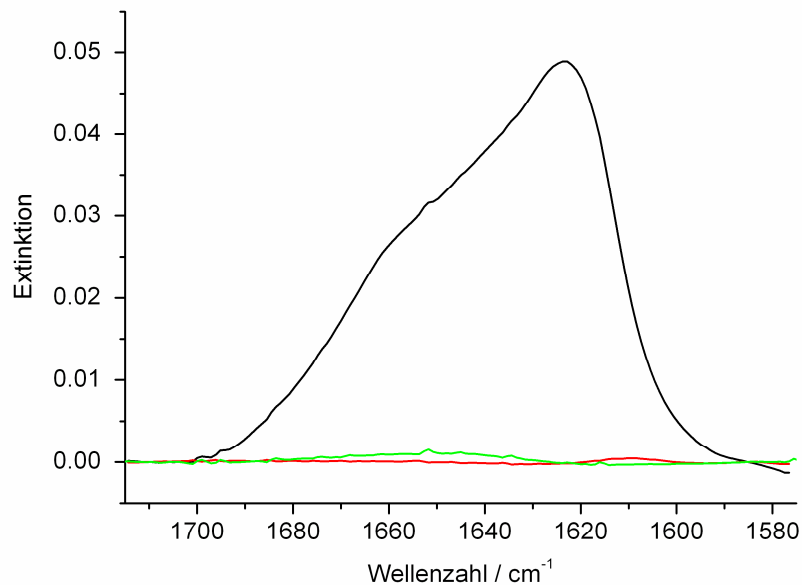


Bild 4.20: ATR-FTIR-Spektren von 10 µM hIAPP in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Lipidmembran (schwarz), 10 µM hIAPP + 10 µM Resveratrol in Abwesenheit der Membran (grün) und 10 µM hIAPP + 10 µM Resveratrol in Gegenwart der anionischen Membran (rot). Alle Spektren wurden nach 20 h Inkubation bei 25 °C in der ATR-FTIR-Zelle aufgenommen [Mishra et al., 2009].

Die für in Gegenwart der Lipidmembran aggregiertes hIAPP charakteristische Amidbande mit einem Maximum bei $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ blieb nach Beimischung von Resveratrol aus (Bild 4.20, rot). Die hIAPP-Moleküle bleiben in Lösung und sind nicht in Kontakt mit der Lipidmembran. Das Einwirken von Resveratrol auf die Fibrillbildung von hIAPP in Abwesenheit der Membran blieb ebenfalls ohne amyloidspezifische Anzeichen.

Aus Messungen der Fluoreszenzintensität des amyloidspezifisch bindenden Farbstoffs Thioflavin T wurde der IC₅₀-Wert von Resveratrol zur Inhibierung der hIAPP-Aggregation auf 3,3 µM bestimmt [Mishra et al., 2009]. Somit könnte Resveratrol als ein geringfügig schwächerer Inhibitor bezeichnet werden als die zuvor untersuchten Rhodaninderivate (mit IC₅₀-Werten von 0,45 µM und 1,23 µM, siehe Abschnitt 4.4.1). Die Unterschiede in den IC₅₀-Werten von unterschiedlichen Komponenten reflektieren jedoch in erster Linie die Tatsache, dass diese in unterschiedlichen Stadien der Fibrillation wirken und/oder an verschiedenen Stellen des Moleküls oder Oligomers

wechselwirken. Im Allgemeinen wird angenommen, dass Polyphenole durch Wechselwirkung mit den hydrophoben Taschen der Fibrillbildungsintermediate in den Verlauf des Aggregationspfades eingreifen.

Begleitende AFM-Messungen zur Untersuchung der Morphologie der Fibrillen zeigten, dass 10 μM hIAPP, welches über 96 h mit Resveratrol im Verhältnis 1:1 in Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 25 °C inkubiert wurde, sphärische Strukturen mit Höhen von 3-4 nm bildet. Im Gegensatz dazu bildete hIAPP ohne Zugabe von Resveratrol die typischen langen, unverzweigten Fibrillen mit Höhen von 3-5 nm.

Für die Inhibition der Fibrillbildung von hIAPP wird eine substöchiometrische Konzentration an Resveratrol benötigt. Das weist zusammen mit den AFM-Untersuchungen darauf hin, dass die Fibrillbildung in einem frühen Stadium unterbrochen wird, jedoch geringfügig später als bei den Rhodaninderivaten. Die Inhibitionsprodukte weisen in diesem Fall kleine, sphärische Strukturen auf. Da diese Off-Pathway-Aggregate nicht zelltoxisch sind [Mishra et al., 2009], kommt Resveratrol als Kandidat für die Entwicklung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes Typ 2 in Frage. Anhand der ATR-FTIR-Spektroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, dass Resveratrol die Fibrillbildung auch in Gegenwart von anionischen Lipidmembranen verhindert, welche dafür bekannt sind, die Aggregation von hIAPP zu induzieren und stark zu beschleunigen.

4.5 Inhibition der IAPP-Aggregation durch Peptid-Inhibitoren

Neben den Molekülinhibitoren werden auch natürliche oder chemisch modifizierte Proteine/Peptide als Inhibitoren der hIAPP Fibrillbildung erprobt. In diesem Abschnitt wurde der inhibitorische Effekt der kürzlich entwickelten Peptide NF(N-Me)GA(N-Me)IL (NFGAIL-GI), des 37 Aminosäuren langen, nichtamyloidogenen hIAPP-Analogons [(N-Me)G24, (N-Me)I26]-IAPP (IAPP-GI), des natürlichen hIAPP-Aggregationsinhibitors Insulin und des natürlichen hIAPP-Analogons Ratten-IAPP (rIAPP) auf die Aggregation von hIAPP in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran untersucht. Dazu wurde zunächst die Wechselwirkung dieser Komponenten mit der anionischen Membran sowie die des amyloidogenen Kernpeptids hIAPP (22-27) (NFGAIL) mit der anionischen Lipidmembran untersucht. Anschließend wurden 1:1-Mischungen der oben genannten Komponenten mit hIAPP in Gegenwart der anionischen Lipidmembran inkubiert und dabei ATR-FTIR-spektroskopisch charakterisiert. Schließlich wurde überprüft, ob die zuvor genannten Peptide NFGAIL-GI und IAPP-GI in der Lage sind, in Gegenwart der anionischen Membran aggregierte Fibrillen von hIAPP wieder aufzulösen.

4.5.1 hIAPP-Analoga und Insulin in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran

Zunächst wurden ATR-FTIR-Spektren der einzelnen Komponenten hIAPP, IAPP-GI, NFGAIL-GI, rIAPP, Insulin und NFGAIL an der anionischen Lipidgrenzfläche aufgenommen. Bild 4.21 stellt die Spektren von hIAPP, rIAPP, IAPP-GI, Insulin, NFGAIL-GI und NFGAIL nach jeweils 20 h Inkubation in der mit einer Lipidmembran beladenen ATR-Zelle dar.

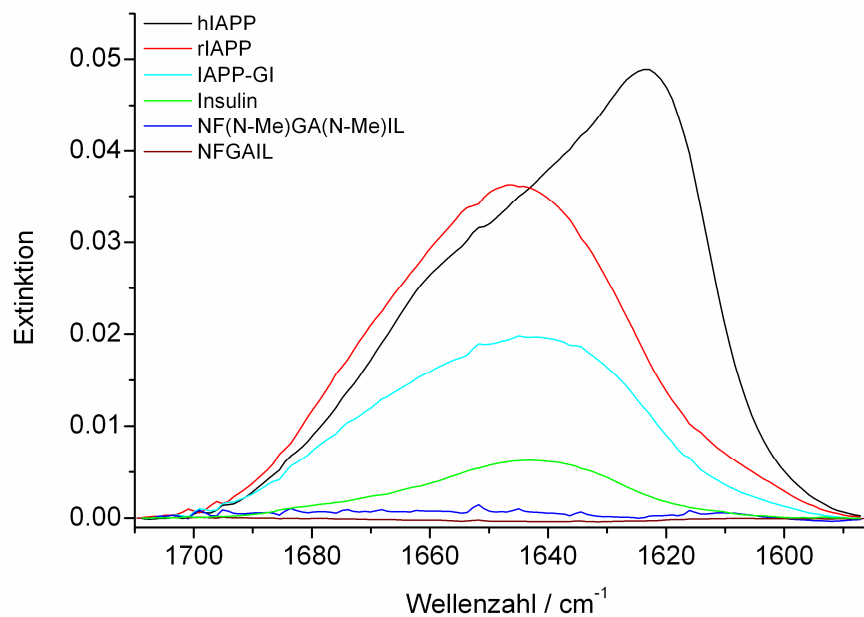


Bild 4.21: ATR-FTIR-Spektren verschiedener Peptide nach 20 h Inkubation in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran.

Die Intensität der nicht normierten Amid-I'-Bande gibt das Ausmaß der Wechselwirkung der einzelnen Komponenten mit der Membran wider. Das Peakmaximum von hIAPP bei $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$ zeigt die Aggregation durch Bildung (paralleler) intermolekularer β -Faltblätter auf. Weiterhin lässt sich erkennen, dass rIAPP zwar ähnlich stark mit der anionischen Lipidmembran interagiert wie hIAPP, jedoch nicht aggregiert. Das Peakmaximum des adsorbierten rIAPP erscheint bei 1647 cm^{-1} , was mit einer weitgehend ungeordneten/ α -helikalen Konformation des in die Lipidmembran insertierten rIAPP übereinstimmt, wie es auch in früheren Studien berichtet wurde [Knight et al., 2006; Engel et al., 2006]. Die Unterschiede zwischen nichtaggregiertem hIAPP (siehe Abschnitt 4.2.3) und dem membranadsorbierten rIAPP sind gering. Für das membranadsorbierte rIAPP wurden Populationen von 28 % Kehren und Schleifen, 13 % α -Helices, 43 % intramolekularer β -Faltblätter und 16 % ungeordneter Konformationen bestimmt. rIAPP in Lösung und membranadsorbiertes rIAPP weisen nahezu identische ATR-FTIR-Spektren auf (siehe Anhang, Abschnitt 6.2), folglich sind keine signifikanten Unterschiede in der Sekundärstrukturzusammensetzung der beiden Spezies festzustellen.

Die Amid-I'-Bande von IAPP-GI besitzt ein Maximum bei $\sim 1643 \text{ cm}^{-1}$, was für einen großen Anteil an Zufallsknäuelkonformationen charakteristisch ist. Die hohe Peakintensität spricht für eine signifikante Wechselwirkung von IAPP-GI mit der Lipidgrenzfläche. Die Unterschiede zwischen hIAPP zu Beginn der Inkubation

(Abschnitt 4.2.3) und IAPP-GI sind ebenfalls gering. Die Amid-I'-Bande von IAPP-GI ist gegenüber der von hIAPP um 2 cm^{-1} von 1646 nach 1644 cm^{-1} verschoben. Quantitative Analyse durch Bandenanpassung ergab eine Zusammensetzung von $\sim 31 \%$ Kehren und Schleifen, 14% α -Helices, 40% β -Faltblättern und 16% ungeordneten Konformationen für IAPP-GI. Die strukturellen Eigenschaften des membran-gebundenen IAPP-GI scheinen daher ähnlich denen des membrangebundenen rIAPP zu sein. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden keine signifikanten Amid-I'-Intensitäten bei NFGAIL-GI und NFGAIL festgestellt. Das heißt, dass diese Peptide gar nicht mit der anionischen Lipidmembran interagieren, möglicherweise aufgrund der fehlenden N-terminalen Sequenz des hIAPP, von der angenommen wird, sie sei hauptsächlich für die Wechselwirkung des hIAPP mit der Lipidmembran verantwortlich [Engel et al., 2006; Lopes et al., 2007]. Im Falle des NFGAIL hat bereits eine starke Aggregation und Fibrillbildung in der wässrigen Phase stattgefunden, während NFGAIL-GI sich bereits zuvor als sehr gut lösliches, nichtamyloidogenes Peptid erwiesen hat [Kapurniotu et al., 2002; Tatarek-Nossol et al., 2005].

4.5.2 hIAPP/Peptidinhibitor - Heterokomplexe

Weiterhin wurden 1:1-Mischungen von hIAPP mit den Inhibitoren IAPP-GI, NFGAIL-GI, Insulin und rIAPP in Gegenwart einer anionischen Lipidmembran inkubiert und dabei die Vorgänge an der Membrangrenzfläche ATR-FTIR-spektroskopisch verfolgt. Bild 4.22 zeigt die ATR-FTIR-Spektren der 1:1 Mischungen des jeweiligen Peptids mit hIAPP nach 20 h Inkubation an der anionischen Lipidgrenzfläche.

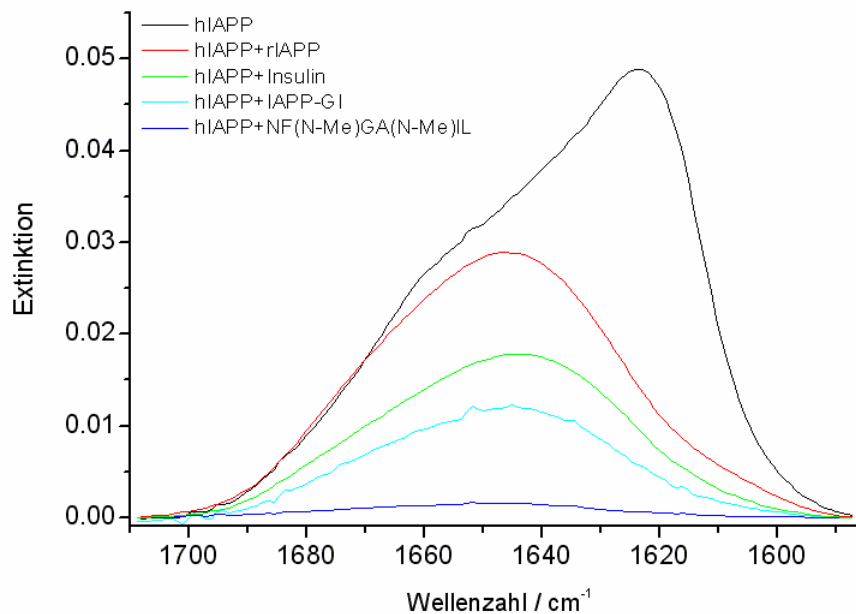


Bild 4.22: Vergleich der Amid-I'-Banden von amyloidogenem hIAPP und 1:1-Mischungen von hIAPP mit rIAPP, Insulin, IAPP-GI oder NFGAIL-GI nach jeweils 20 h Inkubation in der mit einer anionischen Membran beladenen ATR-Zelle.

Für alle gezeigten Mischungen konnte keine Bildung intermolekularer β -Faltblätter und Amyloide beobachtet werden. Bei IAPP-GI, Insulin und rIAPP darf angenommen werden, dass diese die hIAPP-Aggregation und Fibrillbildung stark inhibieren. Deren Heterokomplexe mit hIAPP weisen jedoch immer noch eine Wechselwirkung mit der Membran auf, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als die Komponenten alleine (Bild 4.21). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die N-terminale Sequenz des hIAPP, welche sich in die Lipiddoppelschicht einbaut, nicht vollständig durch die Heterokomplexbildung mit den Peptiden blockiert wird. Vergleiche der FTIR-Spektren der reinen Peptidkomponenten mit den Spektren der hIAPP-Peptidmischungen offenbaren, dass durch die Heterokomplexbildung keine signifikanten Konformationsänderungen auftreten (Bild 4.21 und Bild 4.22).

Das sechs Aminosäurenreste zählende Peptid NFGAIL-GI hingegen erwies sich als sehr wirksam, was die Inhibition der Wechselwirkung mit der Lipidmembran anging. Die schwache Intensität der Amid-I'-Bande mit einem Maximum bei $\sim 1646 \text{ cm}^{-1}$ gibt neben der Verhinderung der Aggregation eine verminderte Wechselwirkung des NFGAIL-GI/hIAPP Heterokomplexes mit der Lipidmembran wider. Es lässt sich hieraus schließen, dass der inhibierende Effekt von NFGAIL-GI auf einer Stabilisierung des nichtamyloidogenen Heterokomplexes in der wässrigen Phase beruht, und dass durch das Aufheben der Wechselwirkung mit der Lipidmembran diese inhibierende Eigenschaft noch verstärkt wird.

4.5.3 Einfluss von IAPP-GI und NFGAIL-GI auf an der Membran geformte hIAPP-Fibrillen

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass IAPP-GI in der Lage ist, in wässriger Phase geformte, zytotoxische hIAPP Oligomere und Fibrillen aufzulösen und dadurch deren zelltoxischen Effekt rückgängig zu machen [Yan et al., 2007]. Um festzustellen, ob IAPP-GI auch hIAPP Aggregate und Fibrillen auflöst, die sich an einer anionischen Membran geformt haben und dadurch in die Membran eingebettet sind, wurde IAPP-GI im äquimolaren Verhältnis und im zehnfachen Überschuss zur hIAPP Monomerkonzentration in die ATR-Zelle injiziert, wo zuvor $10 \mu\text{M}$ hIAPP innerhalb von 20 h an der anionischen Lipidmembran aggregiert waren. Zusätzlich wurde auch der Effekt von NFGAIL-GI auf zuvor an der Membran geformte hIAPP-Fibrillen im molaren Verhältnis 1:1 und 10:1 zu hIAPP studiert. Es bleibt anzumerken, dass NFGAIL-GI zumindest nicht in der Lage ist, die Zelltoxizität von in wässriger Phase bereits aggregiertem hIAPP rückgängig zu machen [Tatarek-Nossol et al., 2005]. Für das hIAPP/Inhibitor-Verhältnis 1:1 wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen und für das 1:10-Verhältnis über 7 Tage ATR-FTIR-Spektren aufgenommen.

In Bild 4.23 a) und b) ist zu erkennen, dass beim 1:1-Verhältnis weder bei Inkubation mit IAPP-GI noch mit NFGAIL-GI eine Verminderung der Aggregationsbande von hIAPP stattfand. Nach 100 h Inkubation mit dem Inhibitor war sogar eine weitere Zunahme der Aggregationsbande im Vergleich zu der vom über 20 h aggregierten hIAPP zu beobachten.

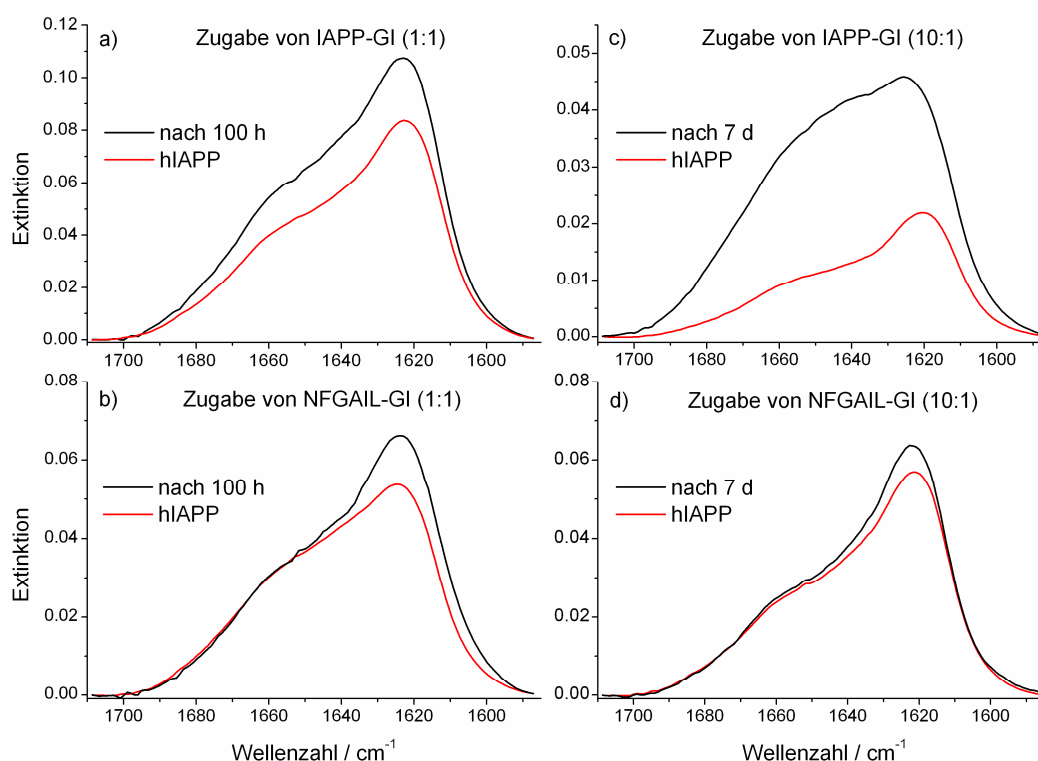


Bild 4.23: Amid-I'-Bande von hIAPP nach 20 h Inkubation an der anionischen Lipidmembran (rote Linien). Links (Schwarze Linien): 100 h Inkubation mit a) (1:1) IAPP-GI oder b) (1:1) NFGAIL-GI. Rechts (Schwarze Linien): 7 d Inkubation, c) 10facher Überschuss IAPP-GI, d) 10facher Überschuss NFGAIL-GI.

Zugabe des 10fachen Überschusses an Inhibitor zu dem bereits aggregierten hIAPP führte im Falle von IAPP-GI (Bild 4.23 c) zu einer starken Zunahme der Amid-I'-Bande, während im Falle von NFGAIL-GI (Bild 4.23 d) keine Zunahme zu verzeichnen war. Diese Beobachtungen können dadurch erklärt werden, dass IAPP-GI stark zu der Intensität der Amid-I'-Bande beiträgt, während NFGAIL-GI nicht an der Membran adsorbiert und somit auch nicht von der evaneszenten Welle der ATR-IR-Strahlung erfasst wird. Die schwache Wechselwirkung von NFGAIL-GI mit der Membran wurde durch ATR-Spektroskopie der Einzelkomponente bestätigt (siehe Abschnitt 4.5.1). Somit lässt sich schließen, dass NFGAIL-GI nicht geeignet ist, Aggregate von hIAPP wieder aufzulösen, die sich in Gegenwart der Lipidmodellmembran geformt haben.

IAPP-GI hingegen adsorbiert an der Membran, so dass die Amid-I'-Bande zusätzlich zu der durch die hIAPP-Fibrillen verursachten Intensität noch einen weiteren ausgeprägten Beitrag durch IAPP-GI erfährt. Dadurch verschiebt sich das Maximum der Amid-I'-Bande in Bild 4.23 c von 1620 nach 1626 cm^{-1} , und es entsteht der Anschein, der Anteil an intermolekularen β -Faltblättern würde auf Kosten von ungeordneten Strukturen abnehmen. Wie jedoch in Bild 4.24 zu erkennen ist, offenbart die Subtraktion des

Beitrages der hIAPP-Fibrillen (rote Linie in Bild 4.23 c, Zeitpunkt $t = 0$ der Zugabe von IAPP-GI), dass eine breite Bande bei $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ zurückbleibt. Die Intensität dieser Bande nimmt mit der Zeit zu, was die zunehmende Adsorption des vorwiegend ungeordneten IAPP-GI anzeigt.

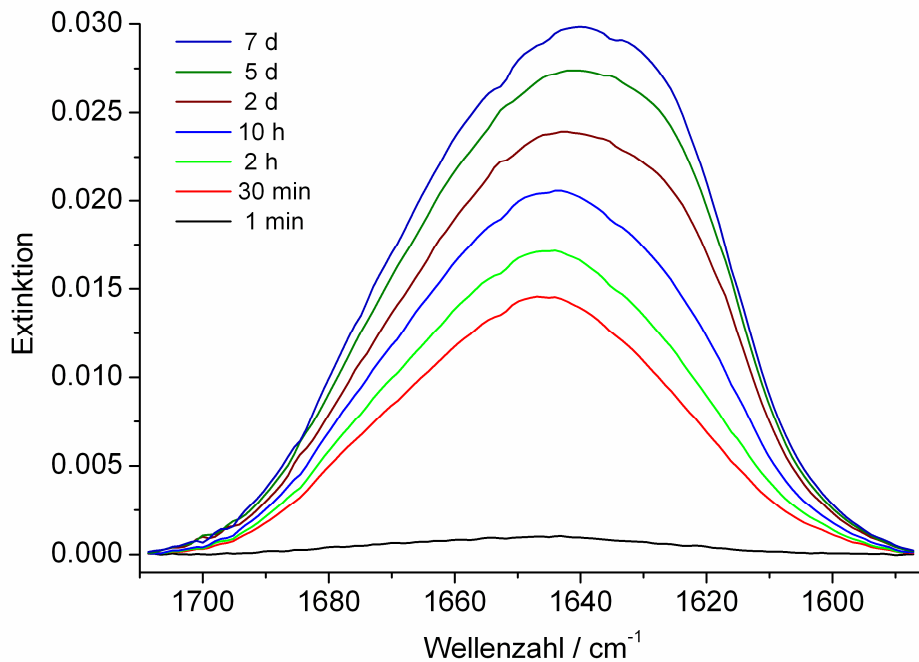


Bild 4.24: Amid-I'-Bande von IAPP-GI nach dessen Zugabe als Peptidinhibitor, nachdem hIAPP in Gegenwart der anionischen Lipidmembran zuvor für 20 h aggregiert war. Anschließend wurde der Beitrag von hIAPP von den hIAPP/IAPP-GI Mischspektren subtrahiert.

Wie in Bild 4.24 des Weiteren zu erkennen ist, verschiebt sich das Maximum der Bande mit der Zeit zu kleineren Wellenzahlen, was sich durch die immer noch fortschreitende Zunahme der hIAPP-Aggregation erklären ließe. Es lässt sich folgern, dass IAPP-GI seine Fähigkeit verliert, hIAPP Fibrillen aufzulösen, wie es in wässriger Phase beobachtet wurde, wenn die Amyloidaggregate in Anwesenheit von Lipiden gebildet wurden. Mögliche Erklärungen dafür sind, dass IAPP-GI mit dem N-Terminus in der Lipidmatrix immobilisiert wird und deshalb nicht mehr mit den hIAPP-Aggregaten interagiert und/oder, dass die Wechselwirkung von IAPP-GI mit den hIAPP-Fibrillen im Gegensatz zu den Gegebenheiten in der wässrigen Phase durch die starre Einbettung der hIAPP-Fibrillen in die Lipidmembran verhindert wird. Die letztere Erklärung wäre im Einklang mit früheren Ergebnissen aus spektroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen [Engel et al., 2008; Domanov & Kinnunen, 2008; Lopes et al., 2007].

4.6 Sekundärstruktur von N-Ras Far/HD in Gegenwart von Raft-Membranen

Kürzlich wurde in einer Studie anhand von AFM-Aufnahmen gezeigt, dass sich N-Ras, welches mindestens einen Farnesyl-Anker enthält, in die flüssig-geordneten Lipiddomänen von kanonischen Raft-Modellmembranen einbaut [Weise et al., 2009]. Durch fortschreitende Diffusion wandern die Proteine anschließend in die flüssig-geordnete/flüssig-ungeordnete Phasengrenze, was zu einer Abnahme der ungünstigen Grenzlinienspannung zwischen den Domänen führt. Durch die räumliche Nähe kommt es zu intermolekularen Wechselwirkungen und es bilden sich Nanocluster/unspezifische Aggregate an den Phasengrenzen. Mit ATR-FTIR-Spektroskopie sollte nun für das Protein N-Ras Far/HD gezeigt werden, ob diese Aggregationsvorgänge auch mit Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins einhergehen. Hierzu wurde nach der Injektion des Proteins (N-Ras Far/HD, 100 µg/ml) in die ATR-Zelle, welche bereits die fertig präparierte Lipid-Raft-Membran enthielt, über einen Zeitraum von 40 h jede 10 min ein ATR-Spektrum aufgenommen. Wie sich herausstellte, konnte in ~30% der Reproduktionsmessungen eine Sekundärstrukturänderung anhand der Änderung der Amid-I'-Bande ausgemacht werden. In allen anderen Fällen blieb die Sekundärstruktur über den gesamten Zeitraum von 40 h unverändert. Daraus ergeben sich zwei unterschiedliche Szenarien für die Sekundärstrukturcharakterisierung von N-Ras Far/HD in Gegenwart von kanonischen DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raftmembranen. Im ersten Fall kommen sich die Proteinmoleküle durch Einlagerung in die Phasengrenzen zwar räumlich sehr nahe [Weise et al., 2009], die Sekundärstruktur des Proteins bleibt jedoch unverändert. Dieses Szenario wird in den folgenden Abschnitten diskutiert. Im zweiten Fall geht das Zusammenlagern in den Phasengrenzen mit einer deutlichen Änderung der Sekundärstruktur einher. Die zugehörigen Spektren und deren Sekundärstrukturanalyse sind im Anhang (Abschnitt 6.3) widergegeben.

Die Ursachen für dieses ambivalente Verhalten sind noch unklar, es wird aber derzeit vermutet, dass die Beschaffenheit der Ge-Oberfläche einen Einfluss auf das Phasenverhalten der Lipide haben könnte, und dass die Oberflächenbeschaffenheit der Ge-Kristalle zufälligen Schwankungen unterliegt, beispielsweise Abnutzung der Oberfläche durch die Mess- und Reinigungsprozeduren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ge-Kristalle nach jeder Messung mit handelsüblichem Spülmittel und Milli-Q-Wasser gereinigt, und in einem zweiten Reinigungsschritt mit Ethanol. Vor einer jeden Messung wurde der gereinigte Ge-Kristall für 30 min mit Niederdruck-

Sauerstoffplasma behandelt, um evtl. verbleibende organische Verunreinigungen vollständig zu beseitigen und um die Oberfläche hydrophil zu aktivieren. Eine genauere Charakterisierung der Oberfläche, vor allem der Rauigkeit, könnte in zukünftigen Studien der Schlüssel zur Handhabbarkeit der Technik für die Untersuchung des Sekundärstrukturverhaltens von (Membran-)Proteinen in Gegenwart von Raft-Modellmembranen sein.

4.6.1 Adsorption von N-Ras Far/HD an eine heterogene DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raft-Membran ohne Änderung der Sekundärstruktur

Die ATR-FTIR-Spektren sind in Bild 4.25 im Bereich der Amid-I'-Bande zu ausgewählten Zeitpunkten nach der Injektion von 1 ml Probe (N-Ras Far/HD, 100 µg/ml) in die mit einer Raft-Membran präparierten ATR-Zelle dargestellt.

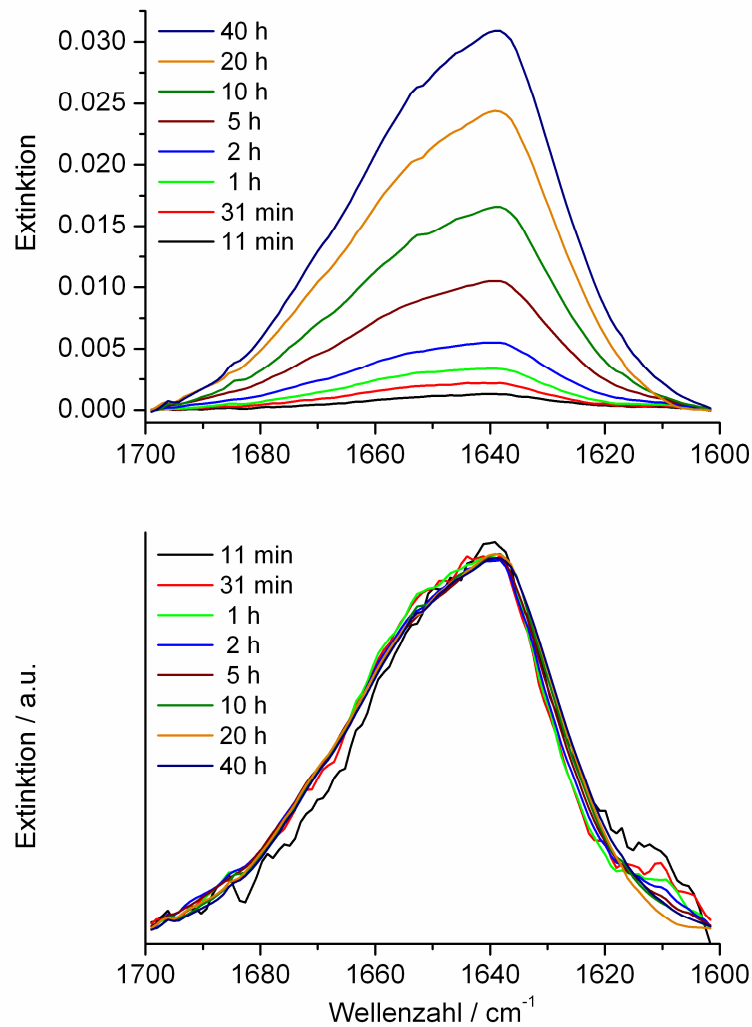


Bild 4.25: Oben: Zeitlicher Verlauf der Amid-I'-Bande von N-Ras Far/HD nach Injektion in die eine Raft-Membran enthaltende ATR-Zelle. Unten: flächennormierte Spektren.

Unten in Bild 4.25 befinden sich die zugehörigen normierten Spektren. Es zeigt sich, dass die Form der Amid-I'-Bande über den gesamten Zeitraum von 40 h keine Änderung erfährt. Lediglich das Signal/Rausch-Verhältnis wird durch die Zunahme der signifikanten Signalintensität und in etwa gleichbleibendes Rauschen mit der Zeit besser.

Durch Auftragen der Fläche der Amid-I'-Bande gegen die Zeit lassen sich grobe Aussagen über die Adsorptionskinetik des Proteins an der festphasengestützten Lipiddoppelschicht treffen (Bild 4.26). Die mittlere quadratische Verschiebung eines Teilchens in einer Dimension [Einstein, 1905] berechnet sich wie folgt:

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt . \quad (4.1)$$

Der Diffusionskoeffizient D von N-Ras Far/HD lässt sich näherungsweise aus der Stokes-Einstein-Beziehung berechnen:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_S}. \quad (4.2)$$

Hierbei bezeichnet η den Viskositätskoeffizienten der Lösung. k_B ist die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Der Stokes-Radius R_S kann aus dem Gyrationradius

$$R_S = \sqrt{\frac{5}{3}} R_G \quad (4.3)$$

abgeschätzt werden.

Der Gyrationradius R_G für Proteine lässt sich aus der Proteinkristallstruktur bestimmen und beträgt für N-Ras (1-172): $R_G = 1,46$ nm [Nedyalkova et al., 2008]. Der Viskositätskoeffizient beträgt für Wasser bei 25 °C $\eta = 89 \cdot 10^{-5}$ Pa·s. Damit ergibt sich nach Gleichungen (4.2) und (4.3) unter Vernachlässigung der Hydrathülle ein Diffusionskoeffizient für N-Ras von $D \approx 1,3 \cdot 10^{-10}$ m²s⁻¹. Die Höhe des Probenraumes der ATR-Zelle beträgt $h \approx 1,4$ mm. Unter der Annahme, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ sämtliche Moleküle im Mittel 0,7 mm von der Membranoberfläche entfernt sind und die Ras-Konzentration unmittelbar an der Oberfläche $c = 0$ beträgt, da Moleküle dort aufgrund von Adsorption aus der wässrigen Phase entfernt werden, lässt sich die Zeit, die ein jedes Molekül im Mittel benötigt, um zur Membran zu gelangen, nach Gleichung (4.1) berechnen: $t \approx 31,39$ min. In Bild 4.26 ist nach $t_{1/2} \approx 531$ min die Hälfte aller Moleküle an die Membran adsorbiert. Die Adsorptionskinetik liegt also in einer anderen Größenordnung als die Diffusion. Die Adsorptionskinetik wird somit vermutlich durch relativ langsame Einbauprozesse des Ras-Moleküls in die Membran bestimmt. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass das N-Ras in der Lösung nicht als Monomeres vorliegt.

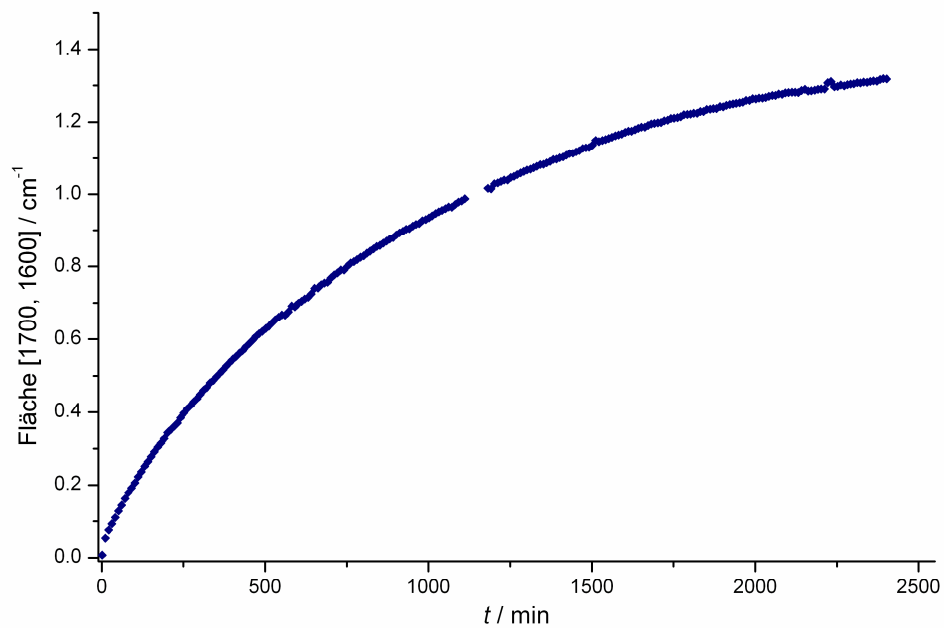


Bild 4.26: Fläche der Amid-I'-Bande von N-Ras Far/HD in Gegenwart einer Raft-Membran in Abhängigkeit der Zeit.

4.6.2 Sekundärstruktur von N-Ras Far/HD

2. Ableitung und Fourier-Self-Deconvolution (Bild 4.27) offenbaren die Lage von Subbanden bei ~ 1677 , 1671 , 1660 , 1654 , 1646 und 1637 cm^{-1} , sowie einer Schulter bei ~ 1627 cm^{-1} . Bild 4.25 lässt sich entnehmen, dass die vermeintlichen Banden bei ~ 1687 und 1610 cm^{-1} , die ebenfalls in Bild 4.27 deutlich zu sehen sind, durch Rauschen bedingt sind und daher nicht zu berücksichtigen sind.

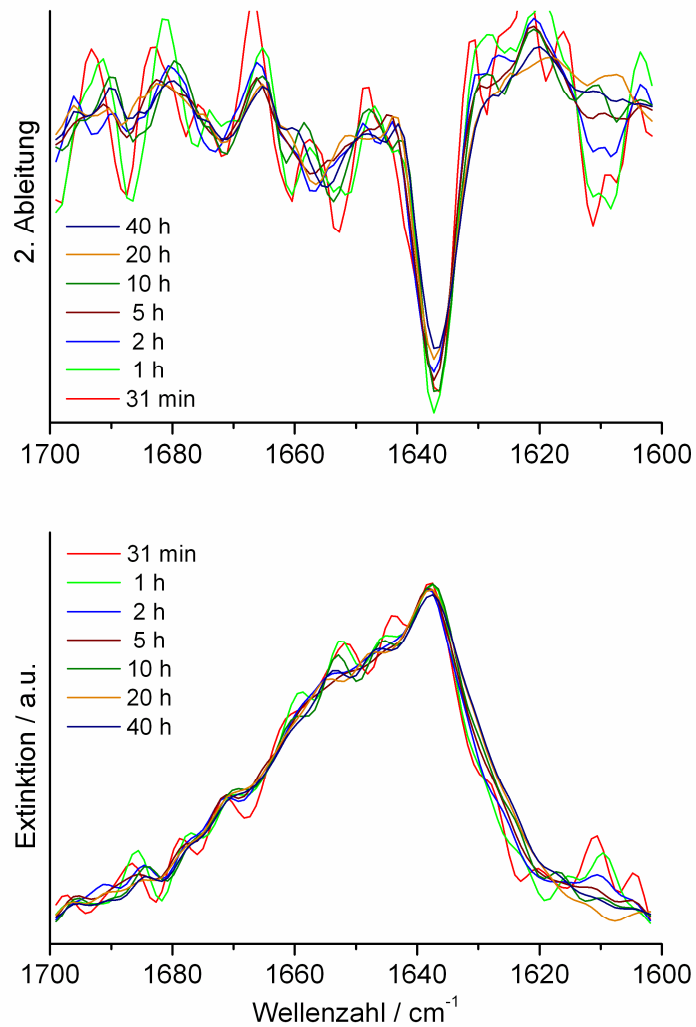


Bild 4.27: 2. Ableitung und Fourier Self-Deconvolution der flächennormierten Spektren aus Bild 4.25.

Anhand von Bild 4.27 wird weiterhin deutlich, dass auch durch die für Sekundärstrukturänderungen sensitiven Bandenauflösungsverfahren 2. Ableitung und Fourier-Self-Deconvolution außer den statistischen Schwankungen keine signifikanten Änderungen auftreten.

Mit den aus Bild 4.27 ermittelten Subbanden wurden Spektren zu unterschiedlichen Zeitpunkten mehrfach mit jeweils leichten Variationen in den Startparametern nach der Levenberg-Marquardt-Methode angepasst, um die Sekundärstrukturzusammensetzung des an die heterogene DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raft-Membran adsorbierenden N-Ras Far/HD zu bestimmen. Bild 4.28 zeigt die ermittelten Sekundärstrukturanteile für jedes Sekundärstrukturelement.

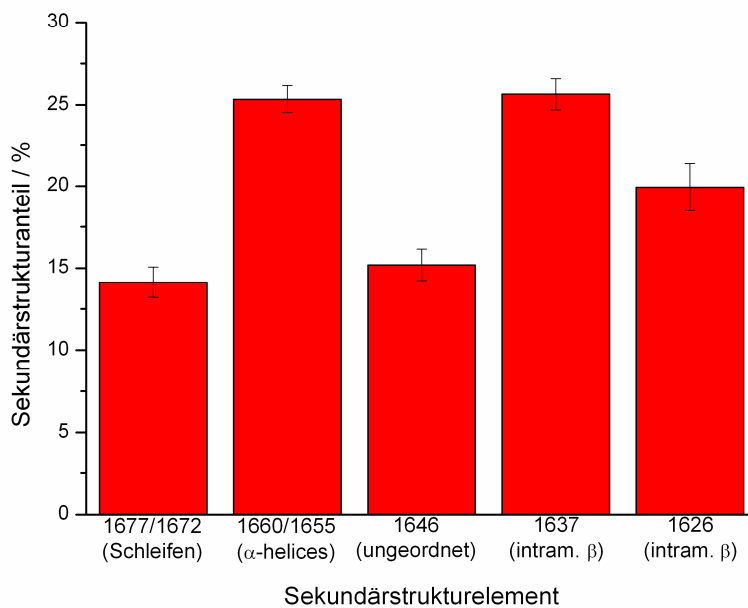


Bild 4.28: Sekundärstrukturanalyse von an die Raft-Membran adsorbiertem N-Ras Far/HD.

Insgesamt wurde für an die Raft-Membran adsorbiertes N-Ras Far/HD eine Sekundärstrukturzusammensetzung von ~14 % Schleifen, 25 % α -Helices, 15 % ungeordneten Strukturen und 46 % β -Strukturen ermittelt. In Tabelle 4.1 werden diese Werte mit Röntgenstruktur- und NMR-Daten von N-Ras (1-166) ohne Ankerregion und mit ATR-FTIR-Daten von N-Ras Far/HD in Gegenwart einer DOPC-Membran gegenübergestellt.

Tabelle 4.1: Literaturvergleich der Sekundärstruktur verschiedener N-Ras-Spezies.

Sekundärstruktur-element	N-Ras (1-166) aus Röntgenstrukturanalyse [Milburn et al., 1990]	N-Ras (1-166) aus NMR-Daten [Kraulis et al., 1994]	DOPC-gebundenes N-Ras Far/HD [Güldenhaupt et al., 2008]	DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) - gebundenes N-Ras Far/HD
β -Faltblätter	25,9 %	22,3 %	25,1 %	46 %
Zufallsknäuel	13,3 %	19,4 %	18,1 %	15 %
α -Helices	37,3 %	35,5 %	33,3 %	25 %
Schleifen	23,5 %	22,8 %	23,5 %	14 %

Beim Vergleich der Sekundärstrukturzusammensetzungen fällt auf, dass die ATR-FTIR-spektroskopisch ermittelten Werte für N-Ras Far/HD in Gegenwart der heterogenen Raft-Membran einen höheren Anteil an β -Strukturen und einen geringeren Anteil an α -Helices und Schleifen aufweisen. Es ist jedoch zu beachten, dass bei der Sekundärstrukturermittlung aus FTIR-Daten der Extinktionskoeffizient der einzelnen Sekundärstrukturelemente nicht bekannt ist, und daher die Ergebnisse nicht zwangsläufig mit denen der für die Sekundärstrukturbestimmung wesentlich genaueren Methoden Röntgendiffraktometrie und NMR übereinstimmen müssen. Im Wesentlichen kommt die Stärke der FTIR-Spektroskopie eher bei der Charakterisierung von relativen Änderungen der Sekundärstruktur über die Zeit zur Geltung. Abweichungen von FTIR-Daten untereinander können sich durch unterschiedliche Zuordnung der Subbanden zu den Sekundärstrukturelementen ergeben. Beispielsweise wurde die Subbande bei $\sim 1637 \text{ cm}^{-1}$ in dieser Arbeit der intramolekularen β -Faltblattstruktur zugeordnet, während sie von [Güldenaupt et al., 2008] dem Zufallsknäuel zugeordnet wurde. Es gibt zwar empirische Regeln, welche Sekundärstrukturelemente in welchen Wellenlängenbereichen zu finden sind [Abschnitt 2.8; Hariz & Chapman, 1995], jedoch gibt es, wie bereits in Abschnitt 2.8 erläutert, Ausnahmen von diesen Regeln [Fabian & Mäntele, 2002; Barth, 2007]. Im Falle von N-Ras Far/HD wurde die Zuordnung der Sekundärstrukturen zu den Amid-I'-Subbanden bisher nicht eindeutig festgelegt.

5 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 μ M hIAPP bei 25 °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 μ M proIAPP und die Aggregation dauert 7 Tage. In Gegenwart einer Raftmembran ist die Aggregation von 40 μ M 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 flüssigungeordneten/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 Diffusionsgeschwindigkeit 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 Oberflächenbeschaffenheit 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.

6 Anhang

6.1 Einfluss von Chicago Sky Blue und Lacmoid auf die hIAPP-Fibrillbildung in Gegenwart einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Lipidmembran

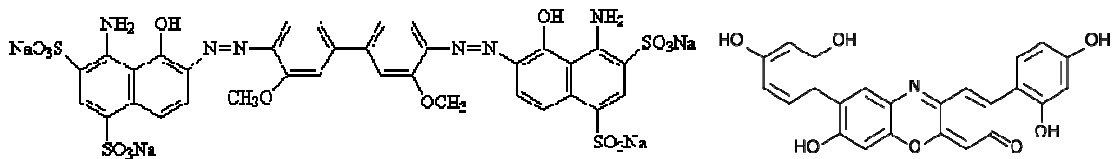


Bild 6.1: Strukturformeln von Chicago Sky Blue 6B (links) und Lacmoid (auch: Resorcinblau, rechts).

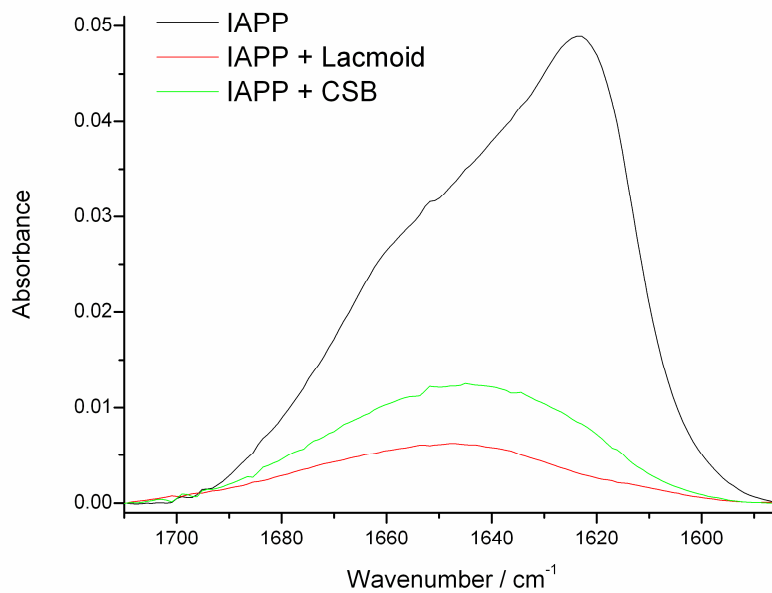


Bild 6.2: Amid-I-Bande nach 20 h Inkubation in der mit einer DOPC/DOPG (7:3) beladenen ATR-Zelle. Schwarz: 10 μ M hIAPP. Grün: 10 μ M hIAPP + 10 μ M Chicago Sky Blue. Rot: 10 μ M hIAPP + 10 μ M Lacmoid.

6.2 Vergleich der ATR-FTIR-Spektren von rIAPP in An- und Abwesenheit einer DOPC/DOPG (7:3) Membran

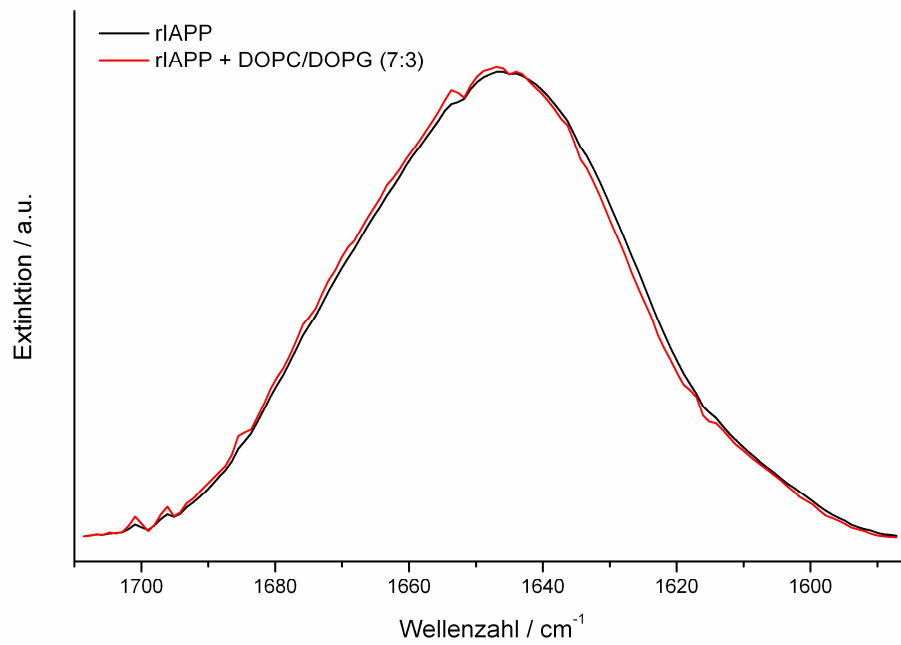


Bild 6.3: ATR-FTIR-Spektren nach 20 h Inkubation von 10 μM rIAPP in An- und Abwesenheit einer anionischen DOPC/DOPG (7:3) Membran.

6.3 Zeitliche Änderung der Sekundärstruktur von N-Ras Far/HD während der Adsorption an eine heterogene DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Raft-Membran

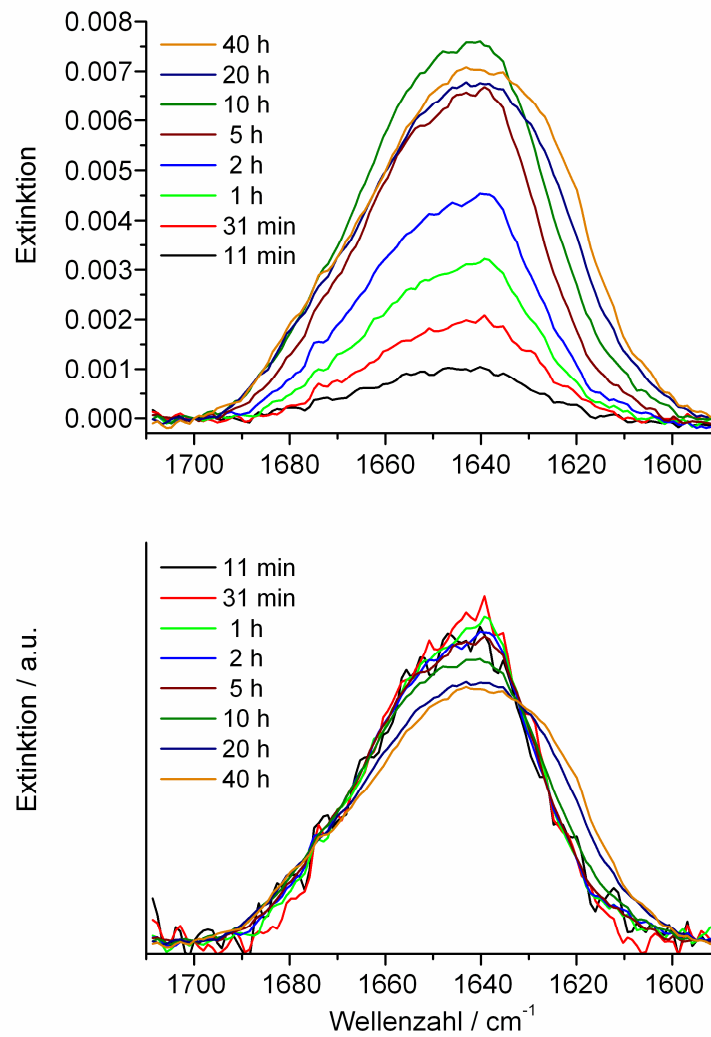


Bild 6.4: Oben: zeitlicher Verlauf der Amid-I'-Bande nach Zugabe von N-Ras Far/HD zu der mit einer DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Lipidmembran präparierten ATR-Zelle. Unten: normierte Spektren zur Visualisierung der Sekundärstrukturumwandlung.

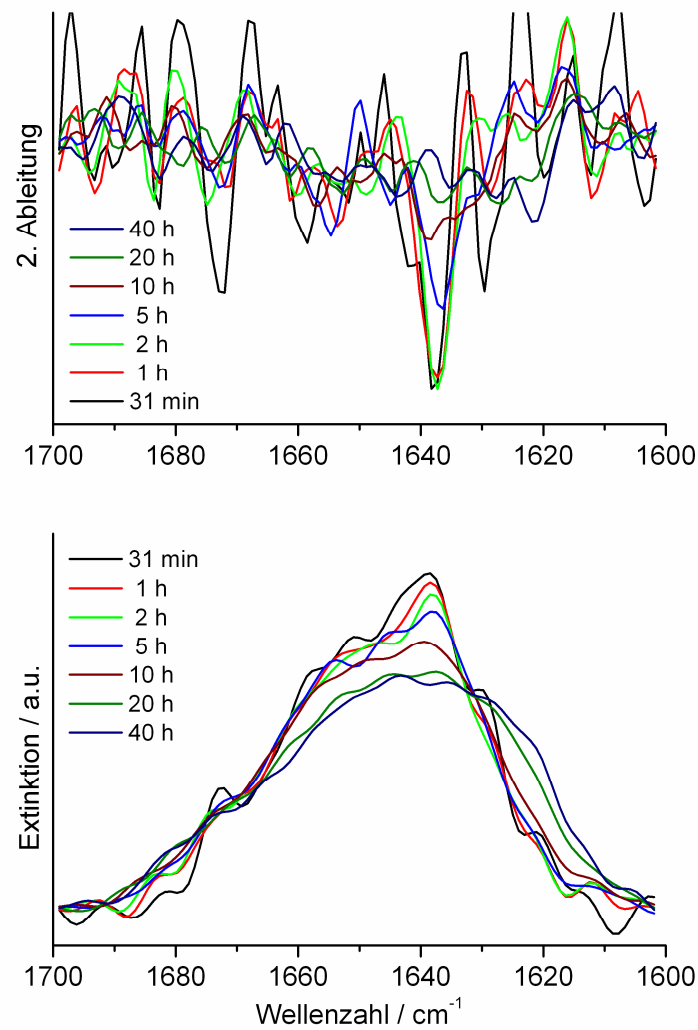


Bild 6.5: 2. Ableitung und Fourier Self-Deconvolution der normierten Spektren aus Bild 6.4. Neben den bereits in Abschnitt 4.6.2 ermittelten Subbanden ist in dieser Messreihe zusätzlich eine „Aggregationsbande“ bei $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ auszumachen.

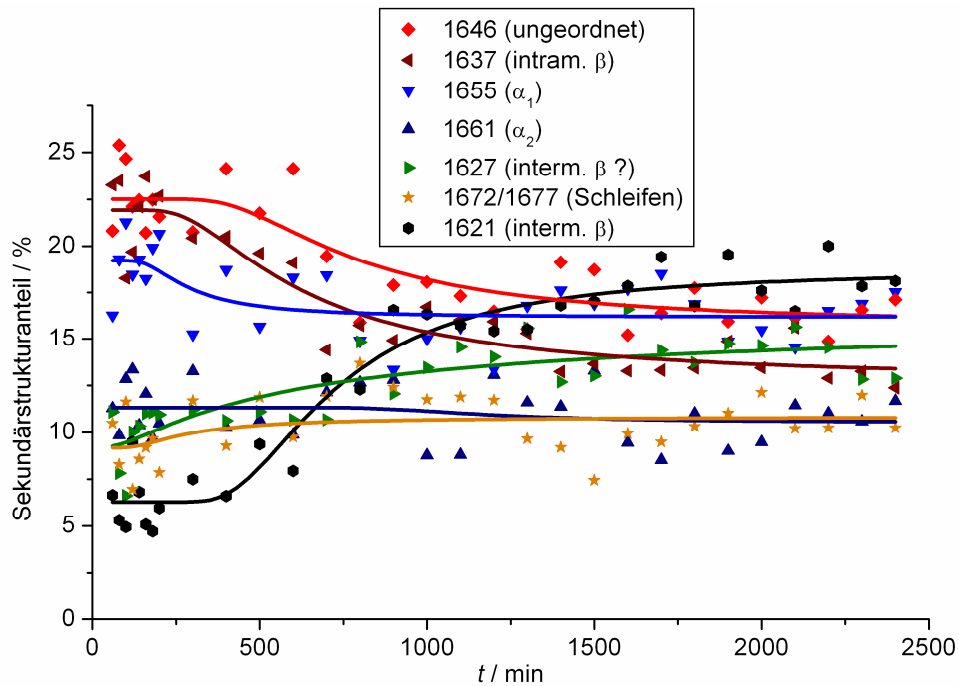


Bild 6.6: Aus der Bandenanpassung erhaltene zeitliche Sekundärstrukturänderung von N-Ras Far/HD bei Adsorption an eine Raft-Membran. Im Wesentlichen ist eine Zunahme von intermolekularen β -Faltblättern auf Kosten von intramolekularen β -Faltblättern und ungeordneten Strukturen festzustellen, während sich die α -Helices und Schleifenstrukturen nur geringfügig ändern bzw. annähernd konstant bleiben.

7 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. (1995). *Molekularbiologie der Zelle / Übers. von Lothar Jaenicke (Leitung)*. 3. Aufl. Weinheim: VCH.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* **181**, 223-230.
- Apetri, M. M., Maiti, N. C., Zagorski, M. G., Carey, P. R. & Anderson, V. E. (2006). Secondary Structure of α -Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy. *J. Mol. Biol.* **355**, 63-71.
- Apostolidou, M., Jayasinghe, S. A. & Langen, R. (2008). Structure of α -Helical Membrane-bound hIAPP and its Implications for Membrane-mediated Misfolding. *J. Biol. Chem.* **283**, 17205-17210.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 1073-1101.
- Brunsveld, L., Kuhlmann, J., Alexandrov, K., Wittinghofer, A., Goody, R. S. & Waldmann, H. (2006). Lipidierte Ras- und Rab-Peptide und Proteine: Synthese, Struktur und Funktion. *Angew. Chem.* **118**, 6774-6798.
- Brunsveld, L., Waldmann, H. & Huster, D. (2009). Membrane binding of lipidated Ras peptides and proteins – The structural point of view. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 273-288.
- Bulic, B., Pickhardt, M., Khlistunova, I., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E. & Waldmann, H. (2007). Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 9215-9219.
- Byler, D. M. & Susi, H. (1986). Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers*, **25**, 469-487.
- Chiti, F. & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333-366.

- Cohen, F. E. & Kelly, J. W. (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* **426**, 905-909.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2000). *The cell – a molecular approach*. 5. Aufl. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
- Dobson, C. M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **356**, 133-145.
- Domanov, Y. A. & Kinnunen, P. K. J. (2008). Islet Amyloid Polypeptide Forms Rigid Lipid-Protein Amyloid Fibrils on Supported Phospholipid Bilayers. *J. Mol. Biol.* **376**, 42-54.
- Ehrnhoefer, D., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A. & Wanker, E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 558-566.
- Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Physik*, **17**, 549-560.
- Engel, M. F. M. (2009). Membrane permeabilization by Islet Amyloid Polypeptide. *Chem. Phys. Lipids* **160**, 1-10.
- Engel, M. F. M., Khemtémourian, L., Kleijer, C. C., Meeldijk, H. J. D., Jacobs, J., Verkleij, A. J., de Kruijff, B., Killian, A. & Höppener, J. W. M. (2008). Membrane damage by islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 6033-6038.
- Evers, F., Jeworrek, C., Tiemeyer, S., Weise, K., Sellin, D., Paulus, M., Struth, B., Tolan, M. & Winter, R. (2009). Elucidating the Mechanism of Lipid Membrane-Induced IAPP Fibrillogenesis and Its Inhibition by the Red Wine Compound Resveratrol: A Synchrotron X-ray Reflectivity Study. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9516-9521.
- Engel, M. F. M., Yigittop, H. A., Elgersma, R. C., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J., de Kruijff, B., Höppener, J. W. M. & Killian, J. A. (2006). Islet Amyloid Polypeptide Inserts into Phospholipid Monolayers as Monomer. *J. Mol. Biol.* **356**, 783-789.

-
- Fabian, H. & Mäntele, W. (2002). Infrared Spectroscopy of Proteins. Reproduced from: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Herg.: Chalmers, J. M. & Griffiths, P. R., Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Fahrenfort, J. (1961). Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. *Spectrochim. Acta* **17**, 698-709.
- Feder, T., Weissmüller, G., Žekš, B. & Sackmann, E. (1995). Spreading of giant vesicles on moderately adhesive substrates by fingering: A reflection interference contrast microscopy study. *Phys. Rev. E*, **51**(4), 3427-3433.
- Fringeli, U. P. (1992). *In Situ* Infrared Attenuated Total Reflection (IR ATR) Spectroscopy: A Complementary Analytical Tool for Drug Design and Drug Delivery. *Chimia* **46**, 200-214.
- 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). Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 6297-6302.
- Gilead, S., Wolfensen, H. & Gazit, E. (2006). Molecular Mapping of the Recognition Interface between the Islet Amyloid Polypeptide and Insulin. *Angew. Chem.* **118**, 6626-6630.
- Goldsbury, C., Goldie, K., Pellaud, J., Seelig, J., Frey, P., Müller, S. A., Kistler, J., Cooper, G. J. S. & Aebi, U. (2000). Amyloid Fibril Formation from Full-Length and Fragments of Amylin. *J. Struct. Biol.* **130**, 352-362.
- Goormaghtigh, E., Raussens, V. & Ruyschaert, J.-M. (1999). Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 105-185.
- Goos, F. & Hänchen, H. (1947). Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion. *Ann. Physik Bd. I*, **6**, 333-346.
- Green, J. D., Kreplak, L., Goldsbury, C., Blatter, X. L., Stolz, M., Cooper, G. S., Seelig, A., Kistler, J. & Aebi, U. (2004). Atomic Force Microscopy Reveals Defects Within Mica Supported Lipid Bilayers Induced by the Amyloidogenic Human Amylin Peptide. *J. Mol. Biol.* **342**, 877-887.

- Güldenhaupt, J., Adigüzel, Y., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Kötting, C. & Gerwert, K. (2008). Secondary structure of lipidated Ras bound to a lipid bilayer. *FEBS J.* **275**, 5910-5918.
- Hariz, P. I. & Chapman, D. (1995). The Conformational Analysis of Peptides Using Fourier Transform IR Spectroscopy. *Biopolymers (Peptide Sci.)*, **37**, 251-263.
- Harrick, N. J. (1960). Surface Chemistry from Spectral Analysis of Totally Internally Reflected Radiation. *J. Phys. Chem.* **64**, 1110-1114.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 574-581.
- Hebda, J. A. & Miranker, A. D. (2009). The Interplay of Catalysis and Toxicity by Amyloid Intermediates on Lipid Bilayers: Insights from Type II Diabetes. *Annu. Rev. Biophys.* **38**, 125-152.
- Higham, C. E., Hull, R. L., Lawrie, L., Shennan, K. I. J., Morris, J. F., Birch, N. P., Docherty, K. & Clark, A. (2000). Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) 'amylin' by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC 3, *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4998-5004.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S. & Cullis, P. R. (1986). Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **40**, 89-107.
- Hull, R. L., Westermark, G. T., Westermark, P. & Kahn, S. (2004). Islet Amyloid: A Critical Entity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3629-3643.
- Jahn, T. R. & Radford, S. E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *FEBS Journal* **272**, 5962-5970.
- Jansen, R., Dzwolak, W. & Winter, R. (2005). Amyloidogenic Self-Assembly of Insulin Aggregates Probed by High Resolution Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **88**, 1344-1353.
- Jarrett, J. T. & Lansbury, Jr., P. T. (1993). Seeding "One-Dimensional Crystallization" of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie? *Cell* **73**, 1055-1058.

-
- Jayasinghe, S., A. & Langen, R. (2004). Identifying Structural Features of Fibrillar Islet Amyloid Polypeptide Using Site-directed Spin Labeling. *J. Biol. Chem.* **279**, 48420-48425.
- Jayasinghe, S. A. & Langen, R. (2005). Lipid Membranes Modulate the Structure of Islet Amyloid Polypeptide. *Biochem.* **44**, 12113-12119.
- Jha, S., Sellin, D., Seidel, D. & Winter, R. (2009). Amyloidogenic Propensities and Conformational Properties of ProIAPP and IAPP in the Presence of Lipid Bilayer Membranes. *J. Mol. Biol.* **389**, 907-920.
- Jeworrek, C., Pühse, M. & Winter, R. (2008). X-Ray Kinematography of Phase Transformations of Three-Component Lipid Mixtures: A Time-Resolved Synchrotron X-Ray Scattering Study Using the Pressure Jump Relaxation Technique. *Langmuir* **24**, 11851-11859.
- Kajava, A. V., Aebi, U. & Steven, A. C. (2005). The Parallel Superpleated Beta-structure as a Model for Amyloid Fibrils of Human Amylin. *J. Mol. Biol.* **348**, 247-252.
- Kapurniotu, A., Schmauder, A. & Tenidis, K. (2002). Structure-Based Design and Study of Non-amyloidogenic, Double N-Methylated IAPP Amyloid Core Sequences as Inhibitors of IAPP Amyloid Formation and Cytotoxicity. *J. Mol. Biol.* **315**, 339-350.
- Kayed, R., Bernhagen, J., Greenfield, N., Sweimeh, K., Brunner, H., Voelter, W. & Kapurniotu, A. (1999). Conformational Transitions of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) in Amyloid Formation in Vitro. *J. Mol. Biol.* **287**, 781-796.
- Khemtémourian, L., Casarramona, G. L., Suylen, D. P. L., Hackeng, T. M., Meeldijk, J. D., de Kruijff, B., Höppener, J. W. M. & Killian, J. A. (2009). Impaired Processing of Human Pro-Islet Amyloid Polypeptide Is Not a Causative Factor for Fibril Formation or Membrane Damage in Vitro. *Biochemistry* **48**, 10918-10925.
- Knight, J. D., Hebda, J. A. & Miranker, A. D. (2006). Conserved and Cooperative Assembly of Membrane-Bound α -Helical States of Islet Amyloid Polypeptide. *Biochem.* **45**, 9496-9508.
- Knight, J. D. & Miranker, A. D. (2004). Phospholipid Catalysis of Diabetic Amyloid Assembly. *J. Mol. Biol.* **341**, 1175-1187.

- Krampert, M., Bernhagen, J., Schmucker, J., Horn, A., Schmauder, A., Brunner, H., Voelter, W. & Kapurniotu, A. (2000). Amyloidogenicity of recombinant human pro-islet amyloid polypeptide (ProIAPP). *Chem. Biol.* **7**, 855-871.
- Kraulis, P. J., Domaille, P. J., Campbell-Burk, S. L., Van Aken, T. & Laue, E. D. (1994). Solution structure and dynamics of Ras p21.GDP determined by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 3515-3531.
- Lopes, D. H. J., Meister, A., Gohlke, A., Hauser, A., Blume, A. & Winter, R. (2007). Mechanism of Islet Amyloid Polypeptide Fibrillation at Lipid Interfaces Studied by Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. *Biophys. J.* **93**, 3132-3141.
- Marambaud, P., Zhao, H. & Davies, P. (2005). Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptides. *J. Biol. Chem.* **280**, 37377-37382.
- Marek, P., Abedini, A., Song, B. B., Kanungo, M., Johnson, M. E., Gupta, R., Zaman, W., Wong, S. S. & Raleigh, D. P. (2007). Aromatic Interactions Are Not Required for Amyloid Fibril Formation by Islet Amyloid Polypeptide but Do Influence the Rate of Fibril Formation and Fibril Morphology. *Biochemistry* **46**, 3255-3261.
- Marquardt, D. W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431-441.
- Marzban, L., Soukhatcheva, G. & Verchere, B. (2005). Role of Carboxypeptidase E in Processing of Pro-Islet Amyloid Polypeptide in β -Cells. *Endocrinology* **146**, 1808-1817.
- Meng, F., Abedini, A., Song, B. & Raleigh, D. P. (2007). Amyloid Formation by Pro-Islet Amyloid Polypeptide Processing Intermediates: Examination of the Role of Protein Heparan Sulfate Interactions and Implications for Islet Amyloid Formation in Type 2 Diabetes. *Biochemistry* **4**, 12091-12099.
- Milburn, M. V., Tong, L., Devos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction – structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science* **247**, 939-945.
- Mishra, R., Bulic, B., Sellin, D., Jha, S., Waldmann, H. & Winter, R. (2008). Small-molecule inhibitors of islet amyloid polypeptide fibril formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 4679-4682.

- Mishra, R., Sellin, D., Radovan, D., Gohlke, A. & Winter, R. (2009). Inhibiting Islet Amyloid Polypeptide Fibril Formation by the Red Wine Compound Resveratrol. *Chem. Bio. Chem.* **10**, 445-449.
- Mouritsen, O. G. (2005). *Life – As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics*. Heidelberg: Springer.
- Nedyalkova, L., Tong, Y., Tempel, W., Shen, L., Loppnau, P., Arrowsmith, C. H., Edwards, A. M., Bountra, C., Weigelt, J., Bochkarev, A., Park, H. (2008). Crystal structure of the human NRas GTPase bound with GDP. *RCSB Protein Data Bank*, PDB ID: 3CON.
- Park, K. & Verchere, C. B. (2001). Identification of a Heparin Binding Domain in the N-terminal Cleavage Site of Pro-islet Amyloid Polypeptide. *J. Biol. Chem.* **276**, 16611-16616.
- Paulsson, J. F., Andersson, A, Westermark, P. & Westermark, G. T. (2006). Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia* **49**, 1237-1246.
- Pechlivanis, M. & Kuhlmann, J. (2006). Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids – More than just membrane anchoring. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 1914-1931.
- Porat, Y., Abramowitz, A. & Gazit, E. (2006). Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**, 27-37.
- Porat, Y., Kolusheva, S., Jelinek, R. & Gazit, E. (2003). The Human Islet Amyloid Polypeptide Forms Transient Membrane-Active Prefibrillar Assemblies. *Biochem.* **42**, 10971-10977.
- Rädler, J., Strey, H. & Sackmann, E. (1995). Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces. *Langmuir*, **11**, 4539-4548.
- Sanke, T., Bell, G. I., Sample, C. & Steiner, D. F. (1988). An Islet Amyloid Peptide Is Derived from an 89-Amino Acid Precursor by Proteolytic Processing. *J. Biol. Chem.* **263**, 17243-17246.

- Scrocchi, L. A., Chen, Y., Waschuk, S., Wang, F., Cheung, S., Darabie, A. A., McLaurin, J. & Fraser, P. E. (2002). Design of Peptide-based Inhibitors of Human Islet Amyloid Polypeptide Fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.* **318**, 697-706.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1973). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Singh, G., Brovchenko, I., Oleinikova, A. & Winter, R. (2008). Peptide Aggregation in Finite Systems. *Biophys. J.* **95**, 3208-3221.
- Sipe, J. D. & Cohen, A. S. (2000). Review: History of the Amyloid Fibril. *J. Struct. Biol.* **130**, 88-98.
- Stuart, B. (1997). Biological Applications of Infrared Spectroscopy. Herg.: Ando, D. J., Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Tatarek-Nossol, M., Yan, L.-M., Schmauder, A., Tenidis, K., Westermark, G. & Kapurniotu, A. (2005). Inhibition of hIAPP Amyloid-Fibril Formation and Apoptotic Cell Death by a Designed hIAPP Amyloid-Core-Containing Hexapeptide. *Chem. Biol.* **12**, 797-809.
- Tatarek-Nossol, M., Yan, L.-M., Schmauder, A., Tenidis, K., Westermark, G. & Kapurniotu, A. (2005). Inhibition of hIAPP Amyloid-Fibril Formation and Apoptotic Cell Death by a Designed hIAPP Amyloid-Core-Containing Hexapeptide. *Chem. Biol.* **12**, 797-809.
- Tatulian, S. A. (2003). Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Method of Choice for Studying Membrane Proteins and Lipids. *Biochem.* **42**, 11898-11907.
- Tenidis, K., Waldner, M., Bernhagen, J., Fischle, W., Bergmann, M., Weber, M., Merkle, M.-L., Voelter, W., Brunner, H. & Kapurniotu, A. (2000). Identification of a Penta- and Hexapeptide of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) with Amyloidogenic and Cytotoxic Properties. *J. Mol. Biol.* **295**, 1055-1071.
- Torii, H. & Tasumi, M. (1996). Theoretical Analyses of the Amide I Infrared Bands of Globular Proteins. In: *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. Mantsch, H. H., & Chapman, D. (Hrsg.). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

-
- Uversky, V. N. & Fink, A. L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochem. Biophys. Acta* **1698**, 131-153.
- Velkova, A., Tatarek-Nossol, M., Andreetto, E. & Kapurniotu, A. (2008). Exploiting Cross-Amyloid Interactions To Inhibit Insulin Aggregation but not Function: Nanomolar Affinity Inhibition of Insulin Aggregation by an IAPP Mimic. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 1-6.
- Vendruscolo, M., Paci, E., Dobson, C. M. & Karplus, M. (2001). Three key residues form a critical contact network in a protein folding transition state. *Nature* **409**, 641-645.
- Weise, K., Triola, G., Brunsveld, L., Waldmann, H. & Winter, R. (2009). Influence of the Lipidation Motif on the Partitioning and Association of NRas in Model Membrane Subdomains. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 1557-1564.
- Westermarck, P., Li, Z.-C., Westermarck, G. T., Leckström, A. & Steiner, D. F. (1996). Effects of beta cell granule components in human islet amyloid polypeptide fibril formation. *FEBS Lett.* **379**, 203-206.
- Yan, L.-M., Tatarek-Nossol, M., Velkova, A., Kazantzis, A. & Kapurniotu, A. (2006). Design of a mimic of nonamyloidogenic and bioactive human islet amyloid polypeptide (IAPP) as nanomolar affinity inhibitor of IAPP cytotoxic fibrillogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2046-2051.
- Yan, L.-M., Velkova, A., Tatarek-Nossol, M., Andreetto, E. & Kapurniotu, A. (2007). IAPP Mimic Blocks Ab Cytotoxic Self-Assembly: Cross-Suppression of Amyloid Toxicity of Ab and IAPP Suggests a Molecular Link between Alzheimer's Disease and Type II Diabetes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1246-1252.
- Yonemoto, I. T., Kroon, G. J. A., Dyson, H. J., Balch, W. E. & Kelly, J. W. (2008). Amylin Proprotein Processing Generates Progressively More Amyloidogenic Peptides that Initially Sample the Helical State. *Biochem.* **47**, 9900-9910.

Danksagung

Mein Dank gilt in besonderer Weise Herrn Prof. Dr. Roland Winter für die Möglichkeit, die ATR-Spektroskopie in der Arbeitsgruppe zu etablieren und vertiefte Kenntnisse auf dem Gebiet amyloidogener Proteine und der Protein-/Lipidwechselwirkungen zu erlangen. Ich danke auch für die großartige Unterstützung, die vielen Ratschläge, erhellenden Diskussionen und die Kritik, die meine Veröffentlichungen und diese Arbeit möglich gemacht haben.

Prof. Dr. Heinz Rehage danke ich für die Übernahme des Koreferats.

PD Dr. Claus Czeslik und Dr. Katrin Weise gilt ein besonderer Dank für die Hilfestellungen, Anregungen und Tipps mit stets hoher Motivation und sachlicher Kompetenz. Dr. Werner Horstmann danke ich für die Hilfe bei zahlreichen administrativen Angelegenheiten. Prof. Dr. Aphrodite Kapurniotu danke ich für die Kooperation sowie für das zur Verfügung Stellen der Peptidinhibitoren und des Plasmids für die proIAPP-Expression. Ich danke Holger Konopka und den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt, Ralf Maserski und den Mitarbeitern der Elektronik-Werkstatt sowie auch Jürgen Pulina und den Mitarbeitern der Glasbläserei. Ein Wort des Dankes möchte ich auch an Dr. Raimund Leibold, Birgitt Volle, Christel Becker, Dr. Reiner Große, Britta Aurich und Rainer Kahner entrichten.

Dr. Vytautas Smirnovas danke ich für die Vertiefung meiner Kenntnisse in der IR-Spektroskopie und das Weiterreichen seiner unschätzbaren praktischen Erfahrung. Michael Šulc und Christoph Jeworrek danke ich für die Hilfe bei der Röntgenreflektometrie. Dr. Rajesh Mitra danke ich für die Einweisung ins Arbeiten mit IAPP und Molekülinhibitoren. Dr. Stefan Grudzielanek danke ich für die Einweisung in die Extruder-Methode. Dr. Anna Lokszejn danke ich für die nützlichen Tipps über IR-Spektroskopie amyloidogener Proteine und die fruchtbaren Dialoge. Ich danke Christian Reichhart und Dr. Julia Sellin für das Korrekturlesen. Bertina Schuppan und Simone Möbitz danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei unzähligen Anliegen. Dr. Oliver Hollmann danke ich für die Einweisung ins Spin-Coating und Tipps bei der Langmuir-Blodgett-Technik. Außerdem danke ich Dr. Dahabada Lopes, Dr. Nadeem Javid, Dr. Diana Radovan, Yong Zhai, Dr. Roland Krivanek, Dr. Gurpreet Singh, Dr. Lally Mitra und Jonas Markgraf.

Andrea Gohlke, Alexander Werkmüller, Andrea Kreusel, Juny Koo, Shobhna Kapoor, Maximilian Andrews, Christian Denter und Kirsten Skodzik danke ich für das viele Lachen und die „Dienstbesprechungen“ im 1. Büro, aber auch für die Hilfsbereitschaft und jederzeitige Unterstützung. Meinem Büronachbarn Dr. Suman Jha danke ich besonders herzlich für die gute Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen während und außerhalb der Dienstzeiten. Auch meinen Büronachbarn Dr. Nagarajan Periasamy, Matthias Pühse, Mirko Erlkamp und Sebastian Grobelny gilt mein besonderer Dank. Sinan Öcal danke ich für die freundschaftlichen Ratschläge in den Mittags- und Kaffeepausen und die vielen guten Gespräche über nicht nur wissenschaftliche Themen.

Zum Abschluss möchte ich mich natürlich ganz besonders bei meinen Eltern Gerhard und Monika Sellin bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben. Ebenso danke ich herzlichst meiner Frau Christeen, meinen Töchtern Lisa und Leah, meiner Schwester Julia und meinen Brüdern Jonathan und Benjamin für die einzigartige Unterstützung.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Familienname:	Sellin
Vorname:	Daniel
Geburtsdatum:	14.11.1977
Geburtsort:	Münster
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Wohnort:	Leibnizstr. 12, 44147 Dortmund
E-Mail:	daniel.sellin@web.de

Schule und Ausbildung:

1984 - 1986	Grundschule Hilstrup in Münster
1986 - 1988	Grundschule Ofenerdiek in Oldenburg
1988 - 1990	Orientierungsstufe Ofenerdiek in Oldenburg
1990 - 1997	Altes Gymnasium in Oldenburg
01.10.1998 - 31.03.2001	Grundstudium und Chemie-Vordiplom an der Gerhard-Mercator-Universität-GH Duisburg
01.04.2001 - 30.9.2001	Hauptstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
01.10.2001 - 31.12.2006	Hauptstudium an der Universität Dortmund mit Studienabschluss Diplom. Thema der Diplomarbeit: „ATR-FTIR-Untersuchungen zum Studium der Wechselwirkung amyloidogener Proteine mit Lipidmembranen“
01.01.2007 - z. Z.	Promotion am Lehrstuhl für Physikalische Chemie an der TU Dortmund bei Prof. Dr. Roland Winter

Berufstätigkeit:

04.08.1997 - 31.08.1998	Zivildienst in der Notaufnahme im Evangelischen Krankenhaus in Oldenburg. Tätigkeit: Patiententransport und Pflegehilfe
22.09.2003 - 09.10.2003	Bürohilfskraft bei der Bundesknappschaft in Essen. Tätigkeit: Datenerfassung und Datenpflege
02.08.2004 - 30.04.2005	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Anorganische Chemie der Universität Dortmund bei PD Dr. A. Kornath. Tätigkeit: Durchführung von Raman-Matrix-Experimenten
24.10.2005 - 19.12.2005	Gewerbliche Hilfskraft in der Druckerei der Knappschaft-Bahn-See in Bochum
01.01.2007 – 28.02.2010	Wissenschaftlicher Angestellter an der Technischen Universität Dortmund
