

Biophysikalische Einblicke in
die Aggregation des Insel-Amyloid-Polypeptids
unter Berücksichtigung
seiner physiologischen Umgebung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht bei der
Technischen Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

vorgelegt von

M.Sc. Janine Seeliger

aus Oberhausen

Dortmund
2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2010 bis Oktober 2013 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Winter angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 30.10.2013

Tag der Disputation: 23.01.2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Winter

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. P. Bastiaens

Erster Gutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Rehage

Wissenschaftliche Mitarbeiterin: Dr. K. Weise

*The day we stop exploring
is the day we commit ourselves to live in a stagnant world,
devoid of curiosity,
empty of dreams.*

Neil deGrasse Tyson (*1958), US-amerik. Astrophysiker

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben.

Mein tiefster Dank gilt in besonderer Weise **Prof. Dr. Roland Winter** für seine fortwährende Unterstützung während der gesamten Promotionsphase. Ich möchte mich für die Möglichkeit der Arbeit an einem äußerst interessanten, interdisziplinären Themengebiet unter Nutzung unterschiedlichster zellbiologischer und biophysikalischer Methoden bedanken. Seine Zeit für zahlreiche wertvolle Diskussionen, die Chance Forschungsprojekte und deren Ausrichtung selbstständig zu erarbeiten und die Möglichkeit Ergebnisse dieser Arbeiten bei nationalen und internationalen Konferenzen präsentieren zu dürfen, wertschätze ich besonders. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Korrektur dieser Arbeit sowie einer Vielzahl von Entwürfen zu Publikationen, Konferenzpostern und Vorträgen.

Ich danke **Prof. Dr. Heinz Rehage** für die Übernahme der Position des zweiten Gutachters dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank kommt **Dr. Katrin Weise**, nicht allein für die Übernahme der Rolle der wissenschaftlichen Mitarbeiterin in der Prüfungskommission und die Korrektur dieser Arbeit, sondern auch für die Einarbeitung in die Rasterkraftmikroskopie, eine Vielzahl gemeinsamer Messungen und viele konstruktive, kritische Diskussionen zu. Darüber hinaus bedanke ich mich für zahlreiche entspannende Mittagspausen und zwei erlebnisreiche verlängerte Konferenzaufenthalte in und um San Diego und Philadelphia.

Der Dank an **Simone Möbitz** kann nicht groß genug ausfallen. Ich bedanke mich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit im Zellkulturlabor, bei der routinemäßigen Kultivierung der Zellen (auch an Wochenenden und Feiertagen), der Etablierung der Zelllinie RBL-2H3 sowie der Isolation von Lipiden. Unsere netten Gespräche haben mir die Arbeit in der Abgeschiedenheit des BMZ-Labors deutlich versüßt.

Auch bei den Bachelorstudentinnen **Nelli Erwin**, **Kathrin Estel** und **Susanne Dogan** sowie bei der Forschungspraktikantin und Masterstudentin **Mimi Gao** bedanke ich mich herzlich für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit an unseren gemeinsamen Forschungsprojekten.

Den besten Bürokollegen, **Dr. Shobhna Kapoor** und **Alexander Werkmüller**, danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre, ihre stetige Diskussionsbereitschaft sowie zahlreiche motivierende Kaffeepausen.

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Claus Czeslik** für seine wertvollen Ratschläge bei theoretischen Fragestellungen sowie technischen und experimentellen Problemen. **Dr. Werner Horstmann** und **Andrea Kreusel** gebührt mein Dank für ihre Hilfe bei der Bewältigung aller auftretenden bürokratischen Probleme. Allen weiteren ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe – **Dr. Andrea Gohlke, Dr. Daniel Sellin, Dr. Christoph Jeworrek, Dr. Juny Koo, Dr. Christian Reichhart, Melanie Berghaus, Mirko Erkamp, Sebastian Grobelny, Marie Kahse, Christopher Rosin, Caroline Schuabb, Vitor Schuabb, Anna Shtamm, Benjamin Sperlich, Saba Suladze, Yong Zhai** und **Bertina Schuppan** – danke ich für die gute und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Zwei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien erfolgten in Kooperation mit Professoren und deren Arbeitsgruppen an anderen Forschungseinrichtungen. Auch diesen Kooperationspartnern möchte ich meinen Dank ausdrücken:

Prof. Dr. Aphrodite Kapurniotu (Division of Peptide Biochemistry, Technische Universität München) danke ich für die Kooperation im Zusammenhang mit der hIAPP/A β -Studie und die Zurverfügungstellung verschiedener Peptide.

Prof. Dr. Christian Griesinger und **Sergey Ryazanov** (Department of NMR-based Structural Biology, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) danke ich für die Zusammenarbeit bezüglich des Screenings verschiedener potentieller Inhibitoren der hIAPP-Aggregation sowie für die Auswahl, Synthese und Bereitstellung der entsprechenden Moleküle.

Außerordentlich dankbar bin ich für die Möglichkeit, ein Mitglied der International Max Planck Research School in Chemical Biology (IMPRS-CB) sein zu dürfen und von zahlreichen Vorträgen angesehener Wissenschaftler, Workshops und jährlichen IMPRS-Stipendiaten-Tagungen zu profitieren. Darüber hinaus ermöglichte mir dieses Stipendium die Teilnahme an internationalen Konferenzen der Biophysikalischen Chemie. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei den beiden Koordinatorinnen der IMPRS-CB, **Christa Hornemann** und **Dr. Waltraud Hofmann-Goody**, für ihre Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner **Familie** und meinen **Freunden** für ihre geduldige und stetige Unterstützung. Während meiner gesamten Studienzzeit haben sie mich stets motiviert und mir den nötigen Rückhalt gegeben.

INHALTSVERZEICHNIS

Kurzfassung	XIII
Abstract	XV
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Faltung und Fehlfaltung von Proteinen	2
1.2 Amyloide	4
1.3 Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP).....	8
1.3.1 Expression und Prozessierung des humanen IAPP	8
1.3.2 Physiologische Rolle des hIAPP	10
1.3.3 Humanes IAPP und Typ II Diabetes mellitus	11
1.4 Biologische Lipidmembranen	15
1.4.1 Lipidklassen in biologischen Membranen.....	16
1.4.2 Phasenverhalten von Lipiden	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Biophysikalische Methoden und deren Durchführung.....	23
2.1 Zellkultur	23
2.1.1 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinie INS-1E.....	23
2.1.2 Zytotoxizitäts-Assay.....	24
2.2 Lipide	26
2.2.1 Isolation zellulärer Lipide.....	26
2.2.1.1 Chloroform/Methanol-Extraktion	26
2.2.1.2 Lipidquantifizierung.....	28
2.2.1.3 Lipidanalyse	29
2.2.1.4 Quantifizierung des Proteingehaltes.....	29
2.2.2 Vesikelpräparation.....	30
2.2.2.1 Große unilamellare Vesikel.....	30
2.2.2.2 Riesige unilamellare Vesikel.....	31
2.3 Peptide und Proteine.....	32
2.3.1 Bezeichnungen und Bezugsquellen	32
2.3.2 Disaggregation der amyloidogenen Peptide.....	33
2.4 FOURIER-Transform-Infrarot-Spektroskopie	33
2.4.1 Transmissions-FTIR-Spektroskopie von Lipiden	36
2.4.2 ATR-FTIR-Spektroskopie von Peptiden	38
2.5 Fluoreszenzspektroskopie (Thioflavin T Assay).....	43
2.6 Optische Mikroskopie	46
2.6.1 Phasenkontrastmikroskopie	47
2.6.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	49

2.7	Rasterkraftmikroskopie.....	53
3	Ergebnisse und Diskussion der einzelnen Projekte	59
3.1	Wechselwirkung des hIAPP mit komplexen, zellulären Lipidmembranen....	59
3.1.1	Hintergrund, Motivation und Zielsetzung.....	59
3.1.2	Isolation und Charakterisierung der β -Zellmembran.....	60
3.1.3	Aggregationsverhalten des hIAPP an der isolierten β -Zellmembran .	64
3.1.4	Permeabilisierung der isolierten β -Zellmembran durch hIAPP.....	68
3.1.5	Zusammenfassung und Diskussion.....	69
3.2	Kreuz-Interaktion von hIAPP und Amyloid β	72
3.2.1	Hintergrund, Motivation und Zielsetzung.....	72
3.2.2	Modifikation der hIAPP Aggregation durch A β	75
3.2.3	Einfluss des A β auf die Membranpermeabilisierung.....	78
3.2.4	Morphologie der hIAPP/A β -Heteroaggregate	81
3.2.5	Zusammenfassung und Diskussion.....	83
3.3	Serum Amyloid P als Chaperon der hIAPP Faltung?.....	86
3.3.1	Hintergrund, Motivation und Zielsetzung.....	86
3.3.2	Aggregationskinetik des hIAPP unter SAP-Einfluss.....	88
3.3.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	91
3.4	Verhalten des hIAPP im Crowding	93
3.4.1	Hintergrund, Motivation und Zielsetzung.....	93
3.4.2	Einschränkung der Diffusion des IAPP durch Crowder	96
3.4.3	Crowder-Einfluss auf die Aggregation des hIAPP	97
3.4.4	Charakterisierung der im Crowding gebildeten Spezies.....	102
3.4.5	Zytotoxizität des hIAPP und Einfluss von Lipiden im Crowding....	106
3.4.6	Zusammenfassung und Diskussion.....	108
3.5	Einfluss von Kosolvenzien auf die Aggregation des hIAPP	111
3.5.1	Hintergrund, Motivation und Zielsetzung.....	111
3.5.2	Aggregationskinetik des hIAPP in Kosolvenzlösungen	112
3.5.3	Sekundärstrukturumwandlung und Morphologie gebildeter Spezies	114
3.5.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	117
3.6	Molekulare Inhibition der hIAPP-Aggregation	119
3.6.1	Hintergrund, Motivation und Zielsetzung.....	119
3.6.2	Screening potentieller Inhibitoren.....	121
3.6.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	126
4	Fazit.....	131
Anhang	135
A.1	Weitere Abbildungen und Tabellen.....	135
A.1.1	Bandenanpassung der Amid-I'-Banden des hIAPP.....	135
A.1.2	AFM-Aufnahmen von hIAPP und A β	136
A.1.3	ATR-FTIR-Spektren des SAP und von hIAPP/SAP-Mischungen ...	137

A.1.4	Diffusionskonstanten und AFM-Ergebnisse des hIAPP im Crowding	138
A.1.5	AFM-Ergebnisse zum Einfluss von Kosolvenzien auf hIAPP	139
A.1.6	ThT-Diagramme der hIAPP/Inhibitor-Studien	140
A.2	IAPP-unabhängige Studie: Interaktion von Ras-Proteinen mit isolierten Plasmamembranlipiden	141
	Literaturverzeichnis	159
	Abkürzungsverzeichnis	179
	Abbildungsverzeichnis	183
	Tabellenverzeichnis	189
	Veröffentlichungen	191
	Erklärung	193

KURZFASSUNG

Biophysikalische Einblicke in die Aggregation des Insel-Amyloid-Polypeptids unter Berücksichtigung seiner physiologischen Umgebung

Die chronische und zelldegenerative Erkrankung Typ II Diabetes mellitus umfasst 90% der an Diabetes erkrankten Patienten weltweit. Als Hauptkomponente der extrazellulären Plaques, die bei Patienten des Typ II Diabetes an den LANGERHANSschen Inseln des Pankreas gefunden werden, wurde das humane Insel-Amyloid-Polypeptid (hIAPP), auch bekannt als humanes Amylin, identifiziert. Die Fehlfaltung, Aggregation und Fibrillenbildung dieses amyloidogenen Peptids steht vermutlich in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankung. Kommt es zur Fehlregulation der Expression oder Prozessierung des hIAPP in den β -Zellen der LANGERHANSschen Inseln, erfolgt die Aggregation des hIAPP in seine fibrilläre Form, welches im Weiteren zum Absterben der pankreatischen β -Zellen beiträgt. Der Prozess der Selbstassoziation des hIAPP, die Bildung intermediärer Strukturen sowie die Interaktion des hIAPP mit zellulären Membranen scheinen dabei maßgeblich für seine Zytotoxizität verantwortlich zu sein. Es gilt heutzutage als sehr wahrscheinlich, dass nicht die fibrillären hIAPP-Strukturen, sondern hydrophobe hIAPP-Oligomere die Permeabilisierung der zellulären Membran und die assoziierte Zytotoxizität verursachen. Die Zerstörung der Membran erfolgt durch die Einlagerung, Strukturumwandlung und das Wachstum der hIAPP-Oligomere innerhalb der Doppelschicht der Lipidmembran. Der genaue Mechanismus der hIAPP-Toxizität, der zum Absterben der β -Zellen führt, ist jedoch nicht entschlüsselt. Für die Entwicklung möglicher therapeutischer Ansatzpunkte bei Typ II Diabetes mellitus und das bessere Verständnis dieses Krankheitsbildes ist es somit von essentieller Bedeutung, ein detailliertes Bild des Aggregationsverhaltens von hIAPP in seiner physiologischen Umgebung zu erlangen. Um dies zu erreichen, muss der Einfluss biologisch relevanter Komponenten auf die Aggregation und die einhergehende Zytotoxizität des hIAPP studiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde in diesem Zusammenhang zunächst der Einfluss isolierter Lipide pankreatischer β -Zellen sowie die Interaktion des hIAPP mit dem ebenfalls amyloidogenen Peptid Amyloid β ($A\beta$) und dem möglichen Chaperonprotein Serum Amyloid P Komponente analysiert. Der Effekt des zellulären Crowdings und von Kosolvenzien wurde in weiteren Studien ermittelt. Darüber hinaus wurden erste Experimente zur Aufdeckung potentieller Inhibitormoleküle gegenüber der Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP durchgeführt, mit dem Ziel, die toxische Oligomerbildung des hIAPP zu verhindern.

Anhand der Ergebnisse der durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass hIAPP in der biologischen Zelle einer Reihe von Wechselwirkungen ausgesetzt ist und somit auch das Aggregationsverhalten des hIAPP in seiner physiologischen Umgebung von einer Vielzahl von Faktoren abhängt. Diese Faktoren, wie zelluläre Membranen, Interaktionsproteine oder selbst das natürliche zelluläre Crowding, beeinflussen die Aggregation des hIAPP auf unterschiedliche Weise. Für isolierte pankreatische β -Zellmembranen konnte eine beschleunigende Wirkung auf die Aggregation des hIAPP, ausgelöst durch eine rasche Adsorption des Peptids an die Membran und folglich lokale Konzentrationserhöhung, ermittelt werden. Darüber hinaus stellen β -Zellmembranen, wie *in vitro* gezeigt werden konnte, den Angriffspunkt des hIAPP dar, welches diese zellulären Membranen permeabilisiert. Diese Zerstörung der β -Zellmembranen stellt somit wahrscheinlich die Ursache der hIAPP-induzierten Zytotoxizität *in vivo* dar. In Anwesenheit des mit der Alzheimerkrankheit assoziierten A β werden hIAPP/A β -Heteroaggregate gebildet, die an die isolierte β -Zellmembran adsorbieren, dort zu Fibrillen aggregieren und schließlich die β -Zellmembran zerstören. Interessanterweise erfolgen diese Prozesse im Vergleich zum reinen hIAPP langsamer, jedoch deutlich schneller als bei reinem A β . Wie am Beispiel der Serum Amyloid P Komponente und des Bovinen Serum Albumins gezeigt, wirken einige Proteine demgegenüber möglicherweise als Chaperone der hIAPP-Faltung und retardieren oder inhibieren durch die Stabilisierung oligomerer hIAPP-Spezies die Aggregation. Andere Faktoren, wie Kosolvenzien oder makromolekulares Crowding, stabilisieren jeweils unterschiedliche hIAPP-Spezies, welches die Aggregation ebenfalls retardieren und zur Reduktion der gebildeten Fibrillenmenge führen kann. Im Allgemeinen kann diese Stabilisierung verschiedener hIAPP-Formen als physiologisch positiver Effekt die Akkumulation nicht toxischer *off-pathway*-Spezies zur Folge haben, wie im Fall des Crowdings gezeigt wurde. Allerdings wäre auch eine Anhäufung toxischer hIAPP-Oligomere als negativer Effekt für die biologische Zelle denkbar. Um die Bildung toxischer Oligomere zu verhindern, konnten in ersten Studien sieben kleine Moleküle, die möglicherweise inhibitorisches Potential gegenüber der Aggregation des hIAPP besitzen, identifiziert werden.

Mit Hilfe der durchgeführten Projekte konnten somit weitere wichtige und detaillierte Einblicke in das Aggregationsverhalten von hIAPP unter Einfluss zellulärer Komponenten erlangt werden. Es wurde aber ebenfalls deutlich, dass das natürliche Aggregationsverhalten des hIAPP *in vivo*, aufgrund der unterschiedlichen und teilweise gegensätzlichen beobachteten Effekte, in seinem gesamten Ausmaß nur schwer mittels *in vitro* Studien zu evaluieren ist. Um ein gesamtheitliches Bild zu erlangen und auf dem Weg der Entwicklung potentieller Therapien gegen Typ II Diabetes mellitus voranzuschreiten, müssen zusätzliche Studien *in cellulo* und *in vivo*, bei denen all diese Faktoren gleichzeitig auf die Aggregation einwirken, herangezogen werden.

ABSTRACT

Biophysical Insights into the Aggregation of Islet-Amyloid-Polypeptide Considering Its Physiological Environment

The chronic and cell degenerative disease, type II diabetes mellitus, comprises 90% of the patients suffering from diabetes worldwide. As a major component of extracellular plaques found at the pancreatic islets of LANGERHANS of type II diabetic patients, the human islet amyloid polypeptide (hIAPP), also known as human amylin, was identified. Misfolding, aggregation and fibril formation of this amyloidogenic peptide seems to be directly linked to the pathogenesis of the disease. The dysregulation of hIAPP expression or processing within the β -cells of the islets of LANGERHANS results in the aggregation of hIAPP into its fibrillar form, which further leads to pancreatic β -cell death. The process of hIAPP self-association, the formation of intermediate structures and the interaction of hIAPP with cellular membranes, seems to be largely responsible for its cytotoxicity. Nowadays it is generally accepted that, instead of fibrillar hIAPP structures, hydrophobic hIAPP oligomers account for the permeabilization of cellular membranes and the related cytotoxicity. The destruction of the membrane results from the incorporation, structural change and growth of hIAPP oligomers within the bilayer of the lipid membrane. However, the exact mechanism of hIAPP toxicity leading to the β -cell death remains uncovered. For the development of potential therapeutic approaches and a better understanding of the disease pattern, it is consequently essential to achieve a detailed picture of the aggregation behaviour of hIAPP in its physiological environment. To obtain this, the influence of biologically relevant components on the aggregation and the accompanying cytotoxicity of hIAPP has to be studied. Towards this end, the work presented in this thesis first explores the influence of isolated lipids of pancreatic β -cells, as well as the interaction of hIAPP with the likewise amyloidogenic peptide amyloid β ($A\beta$), and the possible chaperone serum amyloid P component. The effect of cellular crowding and cosolvents was determined in further studies. Moreover, initial experiments to identify potential inhibitor molecules of hIAPP aggregation and fibril formation were performed to prevent the formation of toxic hIAPP oligomers.

Based on the results of these studies, it has been shown that hIAPP is exposed to a series of interactions within the biological cell, and thus also the aggregation behaviour of the hIAPP in its physiological environment is dependent on a variety of factors. These factors, such as cellular membranes, interacting proteins, or even the natural

cellular crowding, affect the hIAPP aggregation in diverse ways. In case of isolated pancreatic β -cell membranes, an acceleration of the hIAPP aggregation was obtained, caused by the rapid adsorption of the peptide to the membrane thus increasing its local concentration. In addition, as shown *in vitro*, β -cell membranes are the hot spot of hIAPP action, which permeabilizes these cellular membranes. This disintegration of the β -cell membranes seems to be the most probable cause of hIAPP-induced cytotoxicity *in vivo*. In the presence of the Alzheimer's disease associated $A\beta$ peptide, hIAPP/ $A\beta$ -heteroaggregates are formed, which adsorb to the isolated β -cell membrane, aggregate into fibrils and finally, destruct the β -cell membrane. Interestingly, the said effects are slower in comparison to pure hIAPP, but significantly faster than that of pure $A\beta$. In contrast, as observed for the serum amyloid P component and bovine serum albumin, some proteins may possibly act as chaperones of hIAPP folding, resulting in the retardation and inhibition of hIAPP aggregation due to the stabilisation of oligomeric hIAPP species. Other factors, such as cosolvents or macromolecular crowding, stabilise different hIAPP species which also retards the hIAPP aggregation and possibly leads to reduced amounts of accumulated fibrils. In general, the stabilisation of various hIAPP forms may have a physiologically positive effect, i. e., accumulation of non-toxic off-pathway species, as shown in the case of crowding. However, the accumulation of toxic hIAPP oligomers would also be feasible, as a negative effect on the biological cell. To prevent the formation of such toxic oligomers, seven small molecules, which may have inhibitory potential on hIAPP aggregation, could be identified in initial studies.

By means of the conducted projects, crucial and detailed insights into the aggregation behaviour of hIAPP under the influence of cellular components could be obtained. However, it became apparent that it is highly challenging to evaluate the native aggregation propensity of hIAPP *in vivo* in its entire extent by *in vitro* studies, due to the differing and sometimes conflicting effects observed. Finally, in order to gain a holistic picture and to facilitate developing potential therapies for type II diabetes mellitus, additional studies *in cellulo* and *in vivo*, where all these various factors act simultaneously on the aggregation, should be explored.

1

EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die stetige Verbesserung der Lebensverhältnisse in den Industriestaaten, insbesondere hervorgerufen durch große Fortschritte in der medizinischen Versorgung, hat in den letzten Jahrzehnten zu einer deutlichen Verschiebung des Altersdurchschnitts geführt. Lag der Altersmedian im Jahr 1950 in den hoch entwickelten Industriestaaten noch bei 29,0 Jahren, ist es bis 2010 bereits auf einen Wert von 39,7 Jahren gestiegen und wird laut Prognose der Vereinten Nationen im Jahr 2040 ein Maximum von 44,7 Jahren erreichen [1]. Durch die einhergehende Zunahme der Gruppe an Hochbetagten ist bereits heute nicht nur ein drastischer Anstieg an Herz-Kreislauf- und Krebsleiden, sondern auch eine deutlich erhöhte Anzahl an degenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Typ II Diabetes mellitus, Alzheimer oder Parkinson, zu beobachten [2]. Allein in Deutschland stieg die Diabetesprävalenz zwischen 1998 und 2007 von 5,9 auf 8,9%, welches in absoluten Zahlen aktuell einer Patientenzahl von etwa 7 Mio. entspricht. Dabei entfallen 90% der Diabetes mellitus Erkrankungen auf den Typ II [2]. Neben der alternden Bevölkerung werden für diesen Anstieg an Erkrankten auch Risikofaktoren, wie beispielsweise Adipositas, verantwortlich gemacht, die häufig ebenfalls auf die verbesserten Lebensbedingungen der Gesellschaft zurückzuführen sind [2]. Im Fall der Alzheimererkrankung wird die Prävalenz derzeit in den hoch entwickelten Industriestaaten auf 6 bis 9% geschätzt, aber auch hier wird in den kommenden Jahrzehnten ein weiterer massiver Anstieg erwartet [3]. Beide Erkrankungen sind zurzeit nicht heilbar, sodass die stetige Zunahme an Patienten nicht nur die Lebensqualität der Menschen selbst bedroht, sondern durch die enormen entstehenden Kosten auch eine Gefahr für die Finanzierbarkeit der Gesundheitssysteme darstellt.

Seitdem ein Zusammenhang zwischen der Fehlfaltung und Aggregation körpereigener Peptide und Proteine mit der Pathogenese einiger degenerativer Krankheiten, wie Typ II Diabetes mellitus, Alzheimer und Parkinson, bekannt wurde, nahm die Forschungstätigkeit auf diesem Gebiet sehr stark zu. Durch Aufklärung der molekularen Grundlagen der Toxizitätsmechanismen besteht die große Hoffnung, geeignete Therapeutika für diese degenerativen Erkrankungen zu entwickeln, um somit die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern und gleichzeitig die Gesundheitssysteme zu entlasten.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Aggregation des humanen **Insel-Amyloid-Polypeptids** (hIAPP), welches auf molekularer Ebene mit Typ II Diabetes mellitus in Zusammenhang steht, während der Interaktion mit einem isolierten zellulären Lipidsystem, in Anwesenheit molekularer Interaktionspartner und in unterschiedlichen Lösungsumgebungen zu untersuchen. Im ersten Kapitel wird dabei zunächst auf die Grundlagen der Proteinfaltung und Fehlfaltung, den molekularen Zusammenhang des hIAPP mit Typ II Diabetes mellitus sowie grundlegende Charakteristika biologischer Membranen eingegangen. Verwendete biophysikalische Methoden werden im folgenden Kapitel erläutert, bevor die Ergebnisse verschiedener Teilprojekte, nach erneuter kurzer Einführung in den jeweiligen Themenkomplex, im dritten Kapitel im Detail diskutiert werden. Der Zusammenhang der in den einzelnen Teilprojekten ermittelten Ergebnisse wird in einem abschließenden Kapitel verdeutlicht.

1.1 Faltung und Fehlfaltung von Proteinen

Proteine sind die wandlungsfähigsten und strukturell komplexesten biologischen Makromoleküle und spielen eine wichtige Schlüsselrolle in der Funktion der Zelle. Sie dienen unter anderem als katalytische Proteine (Enzyme), als Transport- oder Strukturproteine. Die Proteinbiosynthese erfolgt an den Ribosomen als ungeordnete Polypeptidkette einer Länge von bis zu mehreren Tausend Aminosäuren. Jedes dieser Proteine muss sich demnach im Anschluss an seine Synthese durch die Ausbildung vieler spezifischer intramolekularer Kontakte und Interaktionen in seine native Struktur – ein Ensemble einiger eng verwandter dreidimensionaler Strukturen – falten, um seine biologische Aktivität zu erlangen [4–6]. Das LEVINTHAL-Paradoxon verdeutlicht, dass diese native Proteinkonformation nicht durch systematisches Probieren aller möglichen Konformationen erlangt werden kann. Selbst unter der Annahme einer enorm schnellen Konformationsänderung der einzelnen Aminosäuren würde die Zeit zur Ausbildung der nativen Konformation die Proteinhalbwertszeit in der Zelle deutlich überschreiten [7]. Die Information zur korrekten Faltung eines jeden Proteins muss allerdings schon in seiner Primärstruktur, der Aminosäuresequenz, vorhanden sein, da Proteine auch *in vitro* ihre native Konformation bei günstig gewählten Umgebungsbedingungen einnehmen können [8]. Da die biologische Zelle mit einer zytosolischen Proteinkonzentration von 300–400 g/l eine molekular dicht gepackte Umgebung darstellt [9], wird die Proteinfaltung *in vivo* weiter erschwert. Wie die biologische Zelle diese Faltung ihrer Proteine innerhalb kürzester Zeit in vordefinierte Konformationen trotz der Anwesenheit einer Unzahl konkurrierender Interaktionsmöglichkeiten leistet und wie sie die konformationelle Integrität ihres Proteoms im Fall akuter und chronischer

Angriffe beibehält, ist noch immer eine der fundamentalen und auch medizinisch äußerst relevanten Fragestellungen der Zellbiologie.

Das aktuelle Modell der Proteinfaltung beruht auf verschiedenen Annahmen. Zunächst wird in direkter Folge der Proteinbiosynthese nicht mehr von einer völlig ungeordneten Struktur ausgegangen, da sich jede einzelne Aminosäure bereits unmittelbar nach ihrer Anbindung an die Polypeptidkette in die energetisch günstigste Konformation ausrichtet. Die dabei entstehenden, nicht zufälligen Interaktionen limitieren bereits die Konformationsmöglichkeiten des Proteins zu Beginn der Faltung [5,10]. Weiterhin wird angenommen, dass die anschließende Proteinfaltung entlang einer trichterförmigen Energielandschaft von der relativ ungefalteten Polypeptidkette zum energetisch günstigen nativen Zustand verläuft (Abb 1.1, links) [4,5,11].

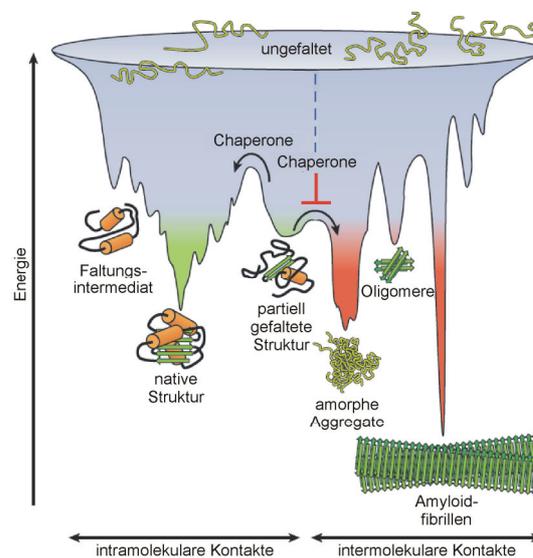


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der trichterförmigen Energielandschaft der Proteinfaltung und -fehlfaltung. Die Rauigkeit der Energielandschaft führt zur zeitweisen Ausbildung von kinetisch gefangenen Konformationen, die zunächst verschiedene Energiebarrieren überwinden müssen bevor sie den nativen Zustand erreichen können (grün). *In vivo* werden diese Schritte durch Chaperone beschleunigt. Die Akkumulation partiell gefalteter Strukturen kann zur Aggregation führen und in der Ausbildung amorpher Aggregate, toxischer Oligomere oder geordneter Amyloidfibrillen resultieren (rot), die normalerweise durch molekulare Chaperone verhindert wird. Modifizierter Nachdruck aus Ref. [4]*.

Diese Energielandschaft besitzt zunächst generell einen relativ flachen Verlauf, da sich die meisten Konformationen des ungefalteten Polypeptids auf einem ähnlichen Energieniveau befinden. Durch zufällige Fluktuationen ausgebildete native Aminosäureinteraktionen, sowie spontane partielle Zusammenlagerungen hydrophober Proteinbereiche, treiben die Reaktion in Richtung der nativen Konformation des Proteins. Die schrittweise Zunahme dieser nativen Kontakte führt zur raschen Verringerung der

*Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* 475, 324–332.), copyright (2011).

möglichen Konformationen, sodass das Energieminimum der nativen Konformation erreicht wird. Hier ist allerdings zu beachten, dass Proteine während der Faltung aufgrund der rauen Energieoberfläche oftmals kinetische Barrieren überwinden müssen. Dabei kann es zur Ausbildung verschiedener kinetisch gefangener Faltungsintermediate oder partiell gefalteter Strukturen kommen, deren Wahrscheinlichkeit mit der Größe und Komplexität der Proteine zunimmt [4,5,12]. Die Sicherung der korrekten Faltung aller Proteine, die Proteinqualitätskontrolle sowie die Erhaltung der Proteomhomöostase *in vivo* erfordert aus diesem Grund ein komplexes Netzwerk weiterer Helferproteine. Eine Hauptrolle spielen hierbei Chaperone, die als Faltungshelfer dienen, indem sie partiell gefaltete oder fehlgefaltete Proteine von unproduktiven Wechselwirkungen abschirmen und somit deren Faltung in den nativen Zustand begünstigen. Weiterhin sorgen die Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes und des Autophagozytose-Apparats für den Abbau fehlgefalteter Proteine [4].

Bei fehlerhafter Proteinqualitätskontrolle – unter Stressbedingungen der Zelle oder wenn das komplexe Chaperon-Netzwerk aus anderen Gründen versagt – kann es zur problematischen Akkumulation partiell gefalteter oder fehlgefalteter Proteine kommen, da diese Proteinzustände zur konzentrationsabhängigen Aggregation neigen (Abb. 1.1, rechts). Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass diese partiell gefalteten oder fehlgefalteten Zustände typischerweise hydrophobe Aminosäuren oder Bereiche des Polypeptidrückgrats exponieren, die im nativen Zustand im Proteinkern verborgen sind. Da auch die intermolekulare Faltung hauptsächlich von hydrophoben Wechselwirkungen geleitet wird, kommt es zur Aggregation, häufig unter Ausbildung amorpher Aggregate. Alternativ können sich allerdings auch fibrilläre Aggregate, sogenannte Amyloide, und deren zytotoxische Vorstufen, die Oligomere, bilden (vgl. Kapitel 1.2). Diese toxischen Oligomere sind dabei vergleichbar mit kinetisch gefangenen Intermediaten der Faltung, da auch sie eine wesentliche Strukturumwandlung auf dem Weg zur fibrillären Struktur, dem thermodynamischen Endstadium des Aggregationsprozesses, durchlaufen müssen [4,5,11].

1.2 Amyloide

Eine Reihe von schwerwiegenden zelldegenerativen Erkrankungen steht in engem Zusammenhang mit der Fehlfaltung und Selbstassoziation von zunächst nicht toxischen Proteinen und Polypeptiden zu zytotoxischen Oligomeren und amyloiden Fibrillen. Zu diesen Krankheiten zählen unter anderem Typ II Diabetes mellitus, Alzheimer und Parkinson. Die gebildeten Protein-/Peptidaggregate lagern sich bei diesen Erkrankungen in den jeweiligen Geweben ab und tragen so zur Symptomatik bei. Obwohl die amyloiden Ablagerungen der verschiedenen Krankheiten aus unterschiedlichen

Polypeptiden bestehen, besitzen alle Aggregate eine ähnliche Morphologie und analoge strukturelle Eigenschaften [13–16].

Für viele der zur Aggregation neigenden Polypeptide konnten bestimmte Strukturen, wie Monomere, Oligomere und amyloide Fibrillen, in verschiedenen Stadien des Aggregationsprozesses beobachtet werden. Die beiden letztgenannten stellen dabei allerdings keine morphologisch homogene Spezies dar, sondern jeweils eine Klasse von Spezies unterschiedlicher Größen, Formen und verschiedener Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen [16,17]. Fibrilläre Strukturen, auch Amyloide genannt, der verschiedenen Polypeptide sind zumeist die am besten untersuchten Spezies, obwohl es sich dabei um die Strukturen mit der geringsten Löslichkeit handelt. Diese Stabilität der Fibrillen trägt allerdings auch zu ihrer relativ leichten Handhabung und Untersuchbarkeit bei. Die sich wiederholende Substruktur der verschiedenen Polypeptidfibrillen besteht aus senkrecht zur Fibrillenachse verlaufenden β -Faltblättern mit parallel zur Achse verlaufenden intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Diese charakteristische Struktur aller amyloider Fibrillen wird als Kreuz- β -Faltblattstruktur bezeichnet (Abb. 1.2) [13–20]. Abhängig von der Art des amyloidogenen Peptids oder Proteins können die einzelnen β -Faltblattstränge durch kurze Schleifen oder signifikante weitere Strukturmodule des Proteins, die sich in diesem Fall außerhalb des fibrillären Kerns befinden, verknüpft sein [13]. Somit bestehen Amyloide aus einem geordneten Arrangement vieler, meist tausender Kopien eines Proteins oder Peptids [13–20]. Diese fibrillären Strukturen konnten mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) in Nanometerauflösung *in vitro* als lange, relativ gerade Strukturen mit einem typischen Durchmesser von 5–15 nm charakterisiert werden. Sie bestehen oft aus mehreren dünneren Protofilamenten eines Durchmessers von 2–5 nm, die sich zu einer periodisch gewundenen Struktur zusammenlagern (Abb. 1.2) [13,18]. Im Röntgenbeugungsdiagramm treten für diese Protofilamente zwei charakteristische Signale auf: ein meridionaler Reflex bei $\sim 4,7 \text{ \AA}$, der den Abstand der β -Faltblattstränge entlang der Fibrillenachse darstellt, sowie ein diffuser äquatorialer Reflex bei 6–11 Å , der den Abstand der β -Stränge senkrecht zur Fibrillenachse widerspiegelt [14,15,19]. Darüber hinaus weisen die amyloiden Strukturen gemeinsame Färbereigenschaften auf, die aus diesem Grund häufig zu ihrem Nachweis verwendet werden. So binden sie den Azofarbstoff Kongorot, welcher zur grünen Doppelbrechung unter kreuzpolarisiertem Licht führt, und erhöhen die Intensität der Fluoreszenzemission des Fluorophors Thioflavin T (ThT) [13,19]. Die Analyse der Struktur von Oligomeren und Monomeren wird im Gegensatz zur Strukturanalyse der Fibrillen in physiologischen Puffern durch ihre Instabilität und Fähigkeit zur schnellen Aggregation erschwert. Es gibt daher sehr unterschiedliche Angaben zur Größe und Beschaffenheit der Oligomere; diese reichen von Clustern aus 10–20 Monomeren bis hin zu mehr als 500 Monomeren [21,22]. Des Weiteren ist oftmals unklar, ob diese

Oligomere während des Prozesses der Fibrillenbildung verbraucht werden (*on-pathway*-Mechanismus) [21,22] oder ob sie sich nicht auf dem Weg zur Fibrillenbildung befinden (*off-pathway*-Mechanismus) [23]. Über die Struktur der Monomere ist ebenfalls sehr wenig bekannt. Zumeist werden sie als ungeordnete Peptide mit partiell α -helikalen Anteilen charakterisiert [24,25].

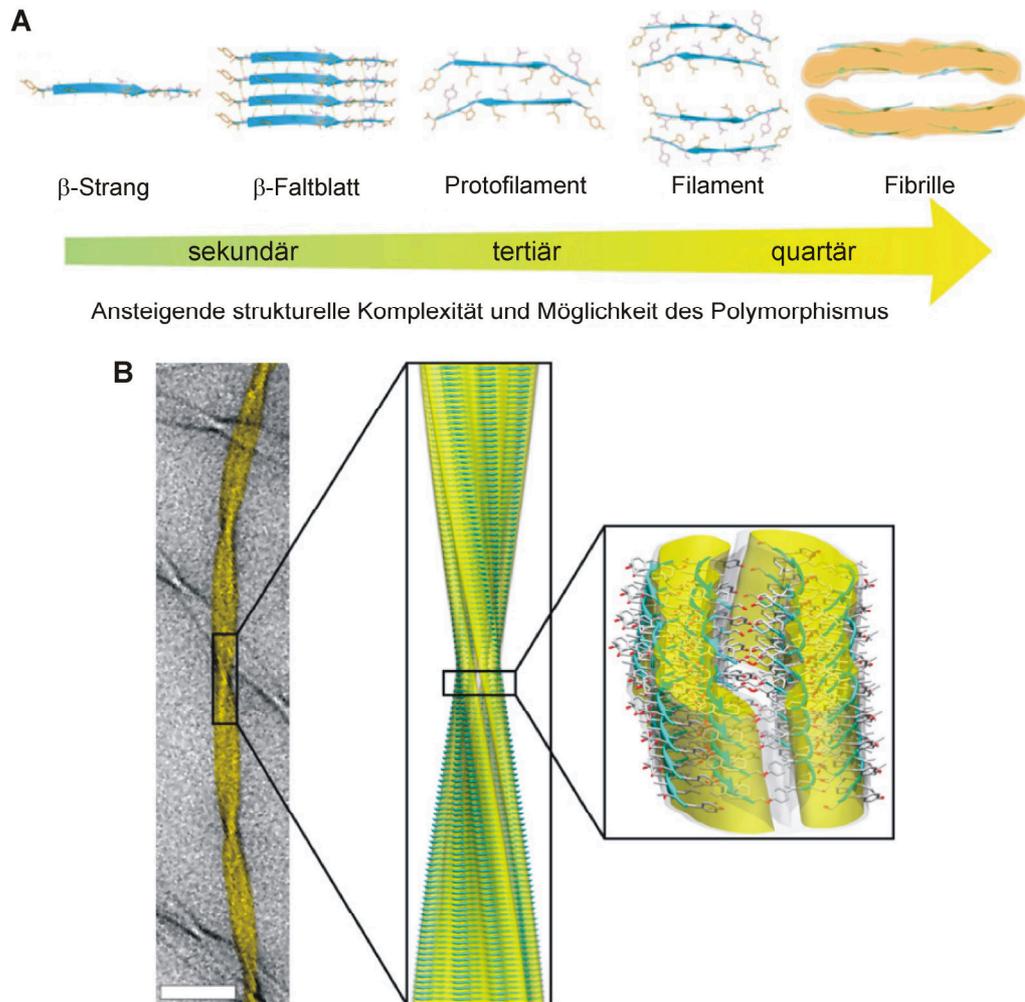


Abbildung 1.2: Schematische und molekulare Darstellung des Aufbaus einer amyloiden Fibrille. **A** Hierarchie der atomar aufgelösten Strukturelemente, die zum Aufbau und zum Polymorphismus einer amyloiden Fibrille beitragen. **B** TEM Aufnahme (links, Maßstab 50 nm), Cryo-EM Rekonstruktion (Mitte) und darin eingepasste über MAS-NMR-*(magic angle spinning-nuclear magnetic resonance)*-Spektroskopie ermittelte atomare Struktur einer Fibrille, bestehend aus drei Filamenten (rechts). Modifizierter Nachdruck aus Ref. [18]*

Lange Zeit wurden alle *in vivo* auftretenden fibrillären Strukturen für die Ausbildung verschiedener degenerativer Erkrankungen und den damit einhergehenden Gewebeschädigungen verantwortlich gemacht. Aktuell wird allerdings eine wachsende Anzahl an Proteinen ohne Verbindung zu degenerativen Proteinablagerungserkrankungen

*Reprinted from Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L., Ladihansky, V., Müller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., De Simone, A., Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., Orlova, E. V., Griffin, R. G., & Dobson, C. M. (2013) Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5468–5473.

gefunden, die ebenfalls unter bestimmten Bedingungen *in vitro* funktionelle amyloide Fibrillen ausbilden [14,26–28]. Diese, durch die Evolution hoch entwickelten funktionellen Fibrillen, bilden zumeist isomorphe struktur-wirkungsbezogene Einheiten, im Gegensatz zu den mit Krankheiten assoziierten Fibrillen, die in verschiedensten polymorphen strukturellen Zuständen gefunden werden [16,26]. Ein möglicher Grund könnte darin liegen, dass die krankheitsassoziierten Fibrillen durch Fehlfaltung der Polypeptidkette entstehen und ihre Strukturen daher nicht immer das tiefste oder einzig erreichbare lokale Minimum der Energielandschaft der Proteinfaltung (oder hier der Proteinefehlfaltung) darstellen. Weiterhin reagiert die Form der Energielandschaft sensibel auf Änderungen der Aggregationsbedingungen, sodass dies zur Ausbildung unterschiedlicher lokaler Minima führen könnte, die wiederum die Bildung unterschiedlicher polymorpher Strukturen zur Folge hätten [15,16,26].

Historisch bedingt wurden die Ablagerungen amyloider Fibrillen sowohl zur Identifizierung und Charakterisierung der entsprechenden Erkrankungen herangezogen, als auch für die Zytotoxizität verantwortlich gemacht [29]. Neben der Erkenntnis, dass amyloide Fibrillen nicht generell mit degenerativen Erkrankungen assoziiert sind, werden heute meist auch nicht mehr die gereiften Fibrillen als toxische Spezies bei diesen Erkrankungen erachtet. Vielmehr wird angenommen, dass oligomere Vorläuferstrukturen sowie der Prozess der Fibrillenbildung selbst die toxische Komponente sind und zur Degeneration exponierter Zellen bei den entsprechenden Erkrankungen führen [14,30,31]. Der genaue Mechanismus der Fibrillenbildung sowie der Toxizität *in vivo* ist allerdings weiterhin nicht aufgeklärt. Es gibt verschiedene Hypothesen zum Prozess der Fibrillenbildung, wobei im Wesentlichen drei Kategorien unterschieden werden. Dies sind die nukleationsabhängigen Aggregationsmechanismen [32–35], die häufig für die Fibrillenbildung kleiner Peptide herangezogen werden, sowie die Modelle der linearen Zusammenlagerung oligomerer Strukturen [33,36] und der Mechanismus des Domänentausches (*domain-swapping*) [37]. Den am weitesten verbreiteten Mechanismus stellt dabei der Prozess der nukleationsinduzierten Polymerisation dar. Dieser ist durch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Bildung eines Nukleationskeims charakterisiert. Der oligomere Keim entsteht dabei aus mehreren aggregationsfähigen, zunächst relativ ungefalteten Monomeren, die sich bis zu einer kritischen Größe zusammenlagern. Sobald ein Nukleus entstanden ist, erfolgt die rasche Vergrößerung des Keims durch Anlagerung weiterer Monomere oder anderer aggregationsfähiger Spezies. Während die Bildung des Nukleationskeims hierbei thermodynamisch ungünstig ist, erfolgt die anschließende Elongation thermodynamisch deutlich begünstigt und rasch bis hin zur fibrillären Struktur. Nimmt in Folge dessen die Konzentration an verfügbaren Monomeren ab, ist die stationäre Phase erreicht. Entsprechend dieser Einzelprozesse wird der Mechanismus in drei Phasen unterteilt: die Nukleations- oder lag-Phase, die Elongations-/Wachstumsphase und die stationäre

Phase [14,32–35]. Da bei diesem Aggregationsprozess der Nukleationskeim ein hochenergetischer Zustand ist, können Reaktionsbedingungen, die diesen stabilisieren, als Katalysatoren der Fibrillenbildung wirken. Ober- oder Grenzflächen, wie sie in Untersuchungen *in vitro* standardmäßig durch Gefäßwände oder Luft/Wasser-Grenzflächen auftreten, sind Beispiele solcher Katalysatoren. *In vivo* können die Oberflächen der Fibrillen selbst, aber z. B. auch Lipidmembranen als katalytische Oberflächen, an denen Nukleationskeime stabilisiert werden, dienen [20]. Auch für die Toxizität der oligomeren Vorläuferstufen wird den Lipidmembranen eine tragende Rolle zugewiesen. Es wird angenommen, dass die Anreicherung hydrophober oligomerer Spezies an Lipidoberflächen der Zelle zur Permeabilisierung dieser Zellmembranen und damit zum Absterben der Zellen führt (vgl. Kapitel 1.3.3) [20,38,39].

1.3 Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP)

Bereits 1901 wurden Ablagerungen amyloider Aggregate an den LANGERHANSschen Inseln des Pankreas bei Patienten des Typ II Diabetes mellitus beschrieben [40,41]. Weitere Erkenntnisse zum Mechanismus der Bildung dieser Aggregate sowie ihres Beitrages zur Pathogenese der Erkrankung wurden allerdings erst erlangt, seitdem das Peptid, aus dem diese Aggregate bestehen, extrahiert und seine Aminosäuresequenz im Jahr 1987 aufgeklärt wurde. Das aus 37 Aminosäuren bestehende humane Insel-Amyloid-Polypeptid (hIAPP), auch bekannt als humanes Amylin, wurde als amyloidogene und fibrillenbildende Hauptkomponente der extrazellulären Plaques identifiziert [42,43]. Es wird hauptsächlich in den β -Zellen der LANGERHANSschen Inseln des Pankreas exprimiert und dort zu seiner aktiven Form prozessiert. Neben der Expression in pankreatischen β -Zellen wird IAPP in geringen Anteilen auch in δ -Zellen der LANGERHANSschen Inseln, im Gastrointestinaltrakt und in Neuronen produziert [44].

1.3.1 Expression und Prozessierung des humanen IAPP

In den pankreatischen β -Zellen entsteht gereiftes hIAPP durch intrazelluläre Prozessierung aus seinem Vorläuferpeptid, dem PräproIAPP (Abb. 1.3) [45]. Das humane IAPP-Gen wird dabei zunächst zu diesem, aus 89 Aminosäuren bestehenden, PräproIAPP exprimiert [46,47]. Die 22 N-terminalen Aminosäuren dieses Peptids bestehen im Wesentlichen aus hydrophoben Seitenketten und wirken als Signalsequenz, die das Peptid entlang des endoplasmatischen Retikulums (ER) zum *trans*-Golgi-Netzwerk transportiert, bevor sie dort abgespalten wird. Während dieses Transportes am ER wird eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinseitenketten (Cys) an Position 35 und 40 des PräproIAPP (später Cys2 und Cys7 des gereiften IAPP) gebildet [46,47].

Das entstandene, nur noch 67 Aminosäuren umfassende ProIAPP wird im Folgenden durch Prohormon Convertase (PC) Enzyme erst am *trans*-Golgi-Netzwerk und anschließend in neu entstehenden sekretorischen Vesikeln prozessiert. Zunächst werden dabei die 16 C-terminalen Aminosäuren durch PC1/3 abgespalten, wobei auch das Enzym PC2 in der Lage ist, an dieser Stelle der Aminosäurekette zu spalten [48]. In den neu gebildeten sekretorischen Vesikeln ist PC2 allerdings hauptsächlich für die Entfernung der 11 N-terminalen Aminosäuren zuständig [49]. Im Anschluss an die Spaltung durch PC1/3 erfolgt die Abspaltung der verbliebenen basischen Aminosäuren am C-Terminus durch die Carboxypeptidase E (CPE) [50]. Dieser Schritt ist essentiell für die Aktivierung des PAM-(*peptidyl amidating monoxygenase*)-Komplexes, welcher zuletzt die Abspaltung des Glycins an Position 38 sowie die Amidierung des Tyrosins an Position 37 des gereiften hIAPP vornimmt [50,51].

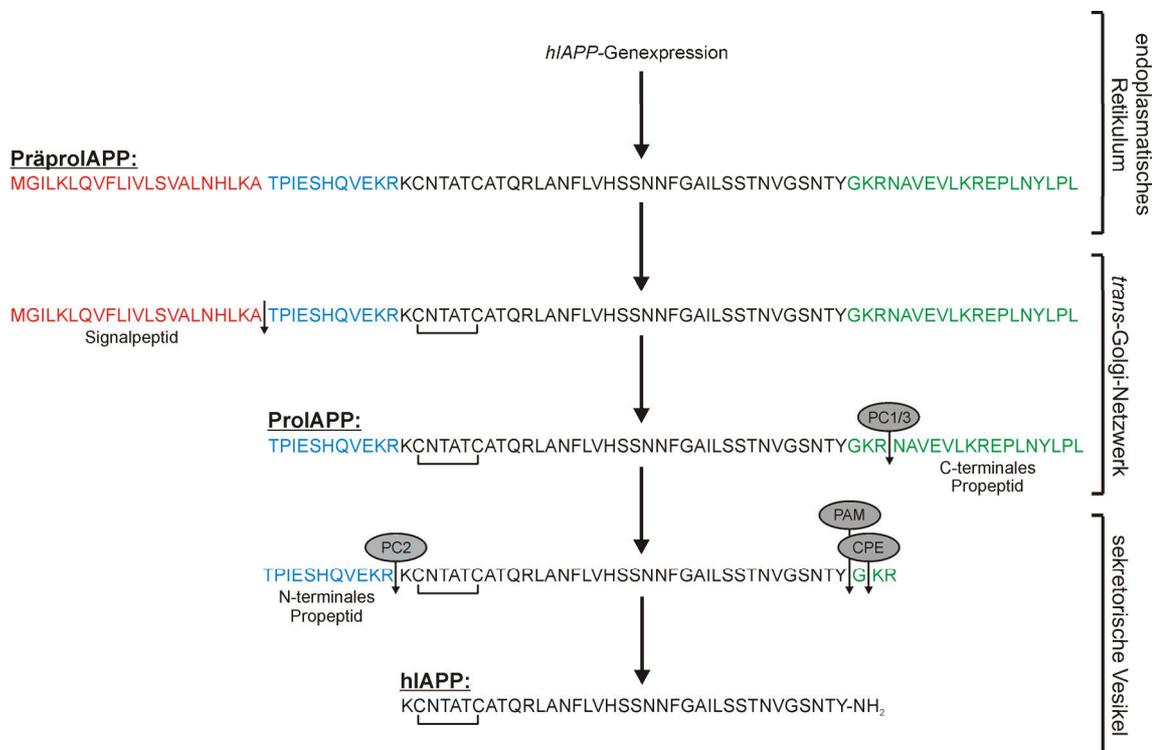


Abbildung 1.3: Intrazelluläre Prozessierung des hIAPP in pankreatischen β -Zellen. Nachdruck aus Ref. [45]*

Das gereifte, 37 Aminosäuren umfassende hIAPP wird im Anschluss an seine Prozessierung zusammen mit Insulin, welches in denselben sekretorischen Vesikeln posttranslational modifiziert wird, in Folge eines Reizes im Verhältnis $\sim 1:100$ in den extrazellulären Raum sekretiert [44].

*Reprinted from Seeliger, J., & Winter, R. (2012) Islet Amyloid Polypeptide: Aggregation and Fibrillogenesis in vitro and Its Inhibitor. In *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease* (Harris, J. R., Ed.), pp 185–209, Springer Science + Business Media, Dordrecht, with kind permission from Springer Science and Business Media.

1.3.2 Physiologische Rolle des hIAPP

Aufgrund partieller Sequenzanalogien wird hIAPP den *calcitonin gene-related peptides* (CGRP) zugeordnet. Diese Peptide wirken normalerweise durch spezifische Bindung an die sieben Transmembrandomänen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Für hIAPP konnte bislang noch kein spezifischer Rezeptor detektiert werden. Stattdessen wurde eine Familie von Rezeptoraktivitätsmodifizierenden Proteinen (*receptor activity-modifying proteins*, RAMP) identifiziert, die durch Dimerisierung mit den G-Protein-gekoppelten Calcitonin-Rezeptoren deren Ligandenaffinität verändern [52]. Dieses Prinzip wurde bis heute nur innerhalb der Calcitonin-Familie entdeckt. Durch die Bindung bestimmter Calcitonin-Rezeptoren mit spezifischen RAMP können somit verschiedene hoch affine hIAPP-Rezeptoren entstehen [53,54]. Beide Komponenten, Calcitonin-Rezeptoren und RAMP, konnten bereits in β -Zelllinien [55], aber auch im Gehirn von Mäusen und Ratten [56,57], welches durch im Blut zirkulierendes IAPP erreicht werden kann, nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus der RAMP-Aktivierung und hIAPP-Bindung ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

Die durch diese Rezeptoren ausgelöste physiologische Funktion des hIAPP ist bisher nicht vollständig geklärt. Das Hauptproblem liegt hier in der Unterscheidung zwischen seiner physiologischen und seiner pathologischen Rolle (vgl. Kapitel 1.3.3). Aktuell wird von zwei plausiblen physiologischen Effekten des hIAPP ausgegangen. Zum einen seiner Funktion als auto- oder parakrines Hormon auf die LANGERHANSschen Inseln, zum anderen seiner Rolle als Hormon mit Effekten auf das zentrale Nervensystem [44]. Innerhalb dieser Funktionen gibt es allerdings stark widersprüchliche experimentelle Ergebnisse. Da hIAPP zusammen mit Insulin in den sekretorischen Vesikeln gelagert und auch mit ihm sekretiert wird, liegt die Annahme nah, dass auch hIAPP in die Regulation des Glukosemetabolismus involviert ist. Dabei wurden zunächst konträre Resultate bezüglich des hIAPP-Effekts auf die Insulinsekretion mit inhibitorischer [58,59] oder ohne Wirkung [60,61] gefunden. Später wurde von einem dualistischen Effekt des hIAPP auf die Insulinausschüttung ausgegangen. Es wurde gezeigt, dass abhängig von der Konzentration des hIAPP eine Stimulation der basalen Insulinsekretion bei geringer Konzentration oder eine Unterdrückung der Insulinausschüttung bei hohen Konzentrationen erfolgt [62]. Auch in Bezug auf die Glukagonregulierung gibt es widersprüchliche Resultate, die von keinem bis hin zum inhibitorischen Effekt reichen [62–64]. Die Wirkung des hIAPP als Anorektikum und sein Effekt auf die Inhibition der Magenentleerung ist dagegen wohl etabliert. In klinischen Studien konnte hierzu für den Wirkstoff Pramlintid, der ein hIAPP-Analogon mit Substitution dreier Aminosäuren durch Prolin ist, eine Reduktion der Kalorienaufnahmen und der Dauer der Mahlzeiten bei gesunden Personen ermittelt werden [65]. Das Medikament SYMLIN[®] (Wirkstoff Pramlintidacetat; Amylin Pharmaceuticals, LLC) ist mittlerweile

in den USA zugelassen und wird dort als Zusatz zur Diabetestherapie mit dem genannten Effekt eingesetzt. Die Wirkung des Pramlintid, wie auch die des hIAPP, soll dabei auf der Bindung an Rezeptoren im Gehirn beruhen, die sich zumindest teilweise außerhalb der Blut-Hirn-Schranke befinden, sodass neben dem zerebral produzierten auch in den LANGERHANSschen Inseln produziertes hIAPP dort binden könnte [66]. Weitere Wirkungen wurden hIAPP bei der Inhibition des Knochenabbaus [67] und der Erweiterung der Blutgefäße (Vasodilatation) [68] zugeschrieben.

1.3.3 Humanes IAPP und Typ II Diabetes mellitus

Die chronische und zelldegenerative Erkrankung Typ II Diabetes mellitus umfasst 90% der an Diabetes erkrankten Patienten weltweit [2]. Obwohl die Pathogenese der Erkrankung sehr komplex ist, gibt es einige gemeinsame Faktoren, die auf die Mehrheit der Patienten zutreffen. So wird zum einen eine verminderte Effektivität des Insulins („Insulinresistenz“) und somit eine erhöhte Nachforderung des Hormons detektiert und zum anderen eine reduzierte Masse an Insulin produzierenden β -Zellen. Weiterhin werden Ablagerungen amyloider hIAPP-Aggregate an den LANGERHANSschen Inseln des Pankreas gefunden.

Typischerweise werden diese fibrillären hIAPP-Ablagerungen in Autopsien erkrankter Typ II Diabetes mellitus Patienten extrazellulär nachgewiesen. Trotzdem gibt es vermehrt Anzeichen aus zellulären Studien, dass die Aggregation des hIAPP intrazellulär beginnt [69–71]. Der genaue Ort, an dem die hIAPP-Aggregation intrazellulär ausgelöst wird, ist allerdings schwierig zu bestimmen; als wahrscheinliche Startpunkte gelten das ER, das Golgi-Netzwerk und/oder die sekretorischen Vesikel. Eine aus diesen Erkenntnissen entwickelte Hypothese des zeitlichen Verlaufs der hIAPP-Fibrillenbildung und –ausbreitung ist in Abbildung 1.4 dargestellt [44]. Die allererste hIAPP-Aggregation erfolgt dabei innerhalb einzelner β -Zellen, möglicherweise in sekretorischen Vesikeln und eventuell zu Anteilen aus unzulänglich prozessiertem ProIAPP [71]. Diese Aggregation führt vermutlich zur Permeabilisierung zellulärer Membranen, welches im Weiteren zum Zelltod und zur Ausbreitung der amyloiden Aggregate in den extrazellulären Raum beiträgt. An dieser Stelle wirken die gereiften hIAPP-Fibrillen als Keime für weitere hIAPP-Monomere, die von anderen β -Zellen sekretiert werden. Es kommt zur extrazellulären Ausbreitung der fibrillären hIAPP-Aggregate, sodass die typischen, bei Typ II Diabetes mellitus detektierten Ablagerungen entstehen. Darüber hinaus kommt es durch die vermehrte Bildung extrazellulärer Fibrillen von außen zur Permeabilisierung der Zellmembranen umliegender β -Zellen und somit auch zu deren Absterben, welches die Reduktion der Masse an β -Zellen bei Typ II Diabetes mellitus erklären würde.

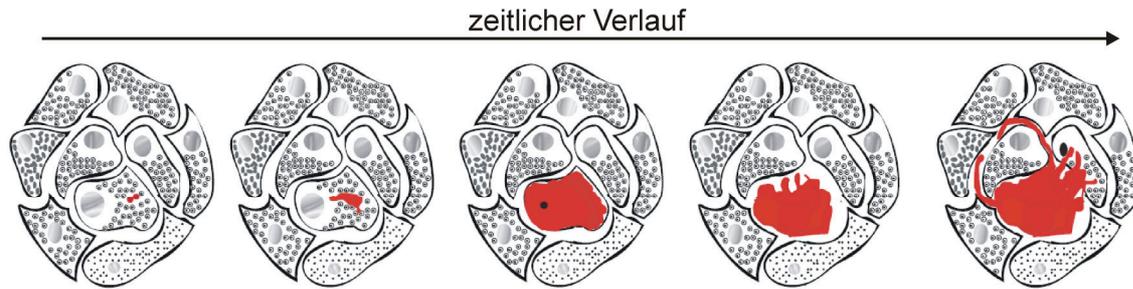


Abbildung 1.4: Hypothese des zeitlichen Verlaufs der hIAPP-Fibrillenbildung und -ausbreitung. Die hIAPP-Aggregation und Fibrillenbildung (rot) startet intrazellulär, möglicherweise in sekretorischen Vesikeln (links). Durch die Permeabilisierung von Membranstrukturen kommt es zur Apoptose und Ausbreitung der fibrillären Aggregate in den extrazellulären Raum. Dort wirken diese als Keime für hIAPP, welches von anderen Zellen sekretiert wird. Es kommt zur weiteren Ausbreitung der hIAPP-Fibrillen und zur Permeabilisierung weiterer β -Zellen (rechts). Modifizierter Nachdruck aus Ref. [44]*.

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, wurden auch im Fall des Typ II Diabetes mellitus lange Zeit fibrilläre hIAPP-Aggregate für die Zytotoxizität und das Absterben der β -Zellen verantwortlich gemacht. In der aktuellen Forschung gibt es allerdings eine Anzahl an Studien, die gereifte hIAPP-Fibrillen als biologisch relativ inert und während der Fibrillogenese gebildete oligomere Intermediate als toxische Spezies identifiziert haben [22,23,30,31]. Trotz dieser Erkenntnis ist der Mechanismus der hIAPP-Toxizität, der zum Absterben der β -Zellen führt, weiterhin nicht völlig aufgeklärt. Er beruht wahrscheinlich auf der Permeabilisierung der zellulären Membran durch hIAPP-Oligomere, wozu es allerdings verschiedene vorgeschlagene Mechanismen gibt. Drei der verbreitetsten Mechanismen werden im Folgenden kurz vorgestellt und sind in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt. Mechanismus **A** beruht auf der Annahme, dass die Membranpermeabilisierung durch vorgeformte, an β -Faltblattstrukturen reiche Oligomere erfolgt. Diese inserieren in die Membran und bilden dort Amyloidporen, ähnlich der Struktur eines Ionenkanals, durch die es zur Destabilisierung der Ionenhomöostase in den Zellen und somit zu deren Absterben kommt [39,72,73]. Alternativ können sich die β -faltblattreichen Oligomere auch innerhalb der Membran nach der Anlagerung von Monomeren ausbilden [73]. Die Hypothese der Bindung von ungeordneten hIAPP-Monomeren an die Lipide der Membran, gefolgt von einer Faltung dieser Monomere in α -helikale Strukturen, wird in Mechanismus **B** dargestellt. In diesem Fall stellen die hydrophoben *on-pathway*-Oligomere durch ihre Membranpermeabilität die toxische Spezies dar [74,75]. In Mechanismus **C** werden die Prozesse der Fibrillenbildung und des Fibrillenwachstums an der Membran als Grund für die toxische Membranpermeabilisierung vorgeschlagen. Bei diesem Prozess erfolgt die Bindung von hIAPP-Monomeren an die Membran, wo es durch die Umwandlung von zunächst oligomeren Spezies zu fibrillären Strukturen und das anschließende Fibrillenwachstum zur Membrandesintegration und Lipidinkorporation in die Fibrillen

*Reprinted from Westermark, P., Andersson, A., & Westermark, G. T. (2011) Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus, *Physiol Rev* **91**, 795–826.

kommt [76]. Welcher dieser Mechanismen zutreffend ist oder ob *in vivo* eine Kombination dieser Mechanismen abläuft, über welche Strukturen die hIAPP-Fibrillenbildung demzufolge genau verläuft, und ob es sich bei den hIAPP-Oligomeren um *on-pathway*- oder *off-pathway*-Spezies handelt, ist bis heute nicht geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung.

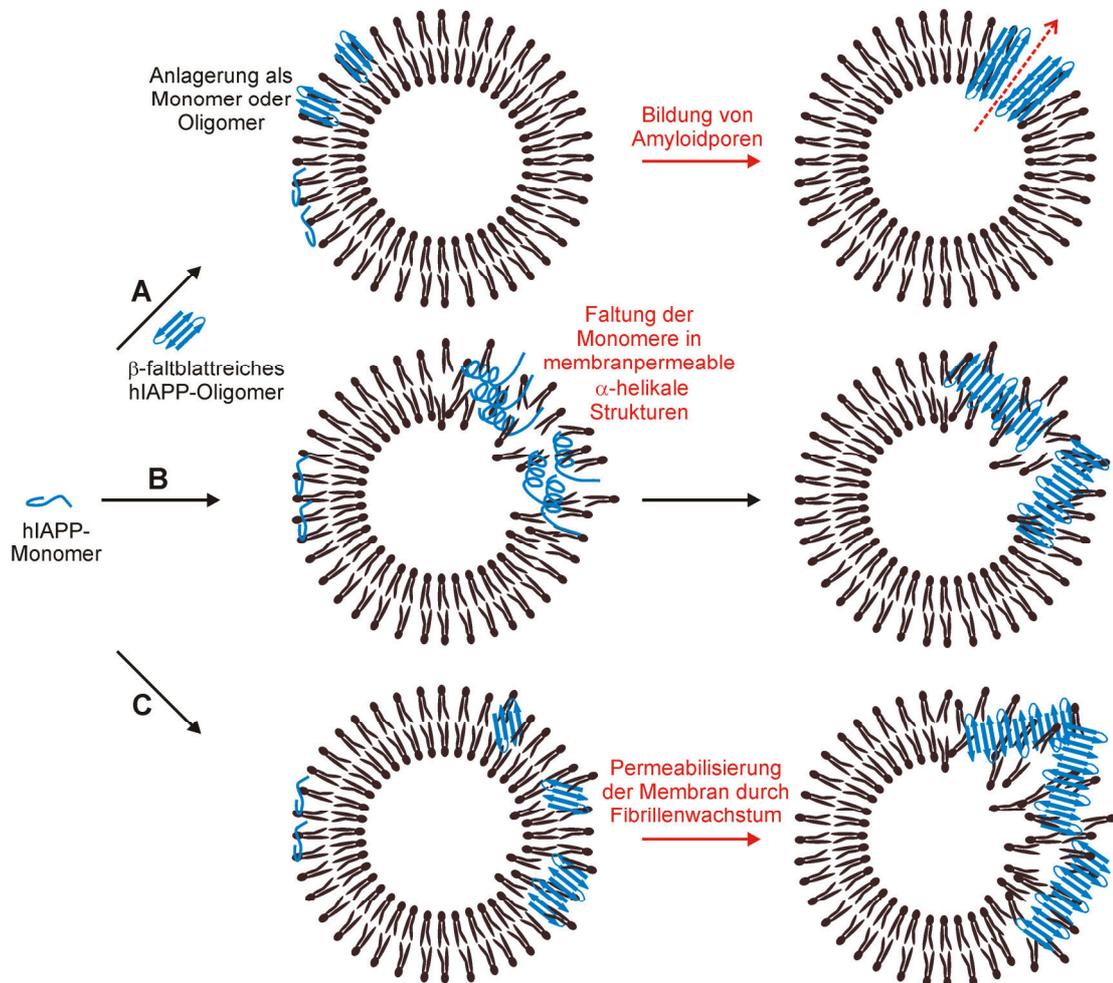


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen der Membranpermeabilisierung durch hIAPP. Die toxischen Mechanismen sind jeweils in Rot dargestellt. **A** Entstehung amyloider Poren durch die Insertion oder Bildung β -faltblattreicher hIAPP-Oligomere in der Membran. **B** Bindung von hIAPP-Monomeren an die Membran mit anschließender Faltung zu membranpermeablen und damit toxischen α -helikalen Strukturen. **C** Permeabilisierung der Zellmembran durch die Umwandlung oligomerer Spezies zu Fibrillen und das anschließende Fibrillenwachstum an der Membran.

Einige Informationen zur Beschaffenheit der unterschiedlichen, an diesen Mechanismen beteiligten Sekundärstrukturen des hIAPP sind allerdings aus *in vitro* Studien bekannt. So nimmt hIAPP in Lösung hauptsächlich ungeordnete Strukturen an, wobei transient auch β -Schleifen und partiell α -helikale Struktur motive beobachtet werden [24,25]. Weiterhin scheint es aufgeklärt zu sein, dass die Anlagerung des hIAPP bevorzugt an partiell negativ geladene Membranen durch den N-terminalen Teil der Sequenz mit seinen positiven Ladungen (Abb. 1.6, blau) ausgelöst wird. Nachfolgend sind für die

Membranassoziation neben den elektrostatischen aber auch hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich, vor allem des in allen Spezies stark konservierten Aminosäurebereichs 10-19 [77,78]. Im Fall der Formation membrangebundener α -helikaler hIAPP-Spezies sind die Aminosäuren der Positionen 5-22 an der Ausbildung dieses Strukturmotives beteiligt. Die gebildeten Helices sind parallel zur Lipiddoppelschicht ausgerichtet. Dabei ist die Seite jeder Helix, welche viele hydrophobe Aminosäureseitenketten enthält, den Lipidketten und die andere, positiv geladene Aminosäuren aufweisende Seite der Helix den Kopfgruppen und der hydrophilen Lösung zugewandt [20,39]. Der Aminosäurebereich 22-37 scheint sowohl in Lösung als auch an Membranen in relativ ungeordneter Struktur zu verbleiben. Erst bei der Ausbildung fibrillärer Strukturen spielt der Bereich der Seitenketten 30-37, der einen β -Faltblattstrang ausbildet, zusammen mit den Seitenketten 8-20, welche den zweiten Strang ausbilden, eine entscheidende Rolle. In humanem IAPP tragen weiterhin auch die Aminosäuren 20-29, die maßgeblich für die amyloidogenen Eigenschaften des humanen IAPP verantwortlich gemacht werden, zur Bildung eines kompakten β -Faltblattes bei [20,39,79].

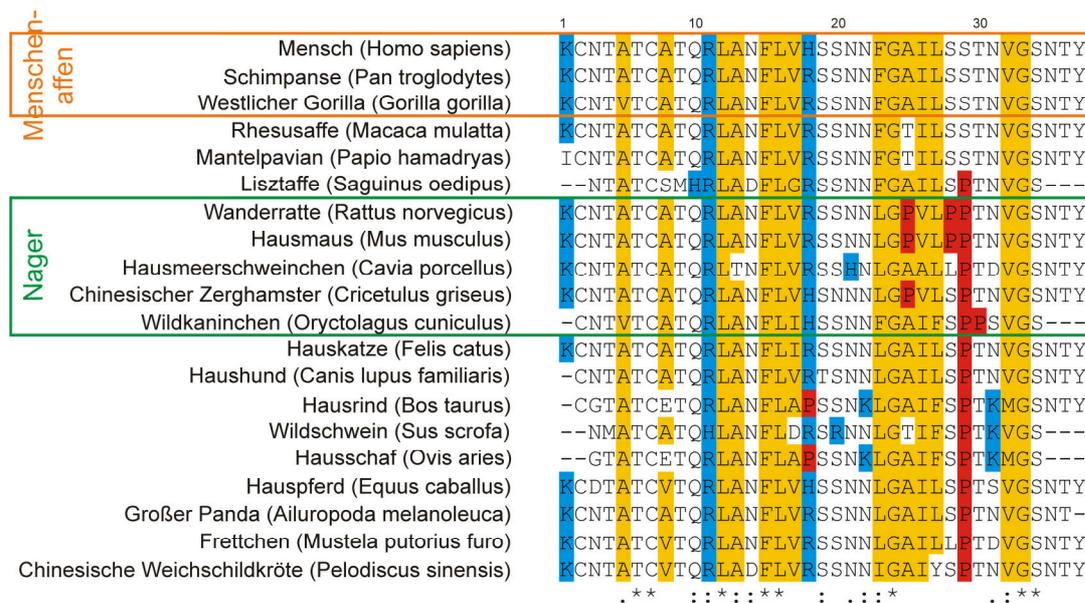


Abbildung 1.6: Sequenzvergleich (*CLUSTAL O (1.1.1) multiple sequence alignment*) der Aminosäuresequenzen des IAPP in verschiedenen Säugetierspezies. Die stark amyloidogenen Sequenzen der Menschenaffen (oranger Kasten) und die nicht-amyloidogenen Sequenzen der Nager (grüner Kasten) sind zum besseren Vergleich hervorgehoben. Die β -faltblattbrechende Aminosäure Prolin ist rot, positiv geladene Aminosäuren sind blau und hydrophobe gelb hinterlegt. Konservierte und teilweise konservierte Aminosäuren sind unterhalb der Sequenzen mit einem Stern, Doppelpunkt oder Punkt gekennzeichnet. Die Sequenzen einiger Spezies sind nicht vollständig aufgeklärt, fehlende Informationen zu Aminosäuren sind mit – versehen.

Die Aminosäuresequenz des IAPP ist in 80% aller Säugetiere konserviert. In einigen Spezies, wie in Menschen, Menschenaffen (Abb. 1.6, oranger Kasten) und anderen Primaten, aber auch in Katzen und Hunden, deren IAPP sehr hohe Sequenzanalogie

zeigt, kommt es zur Aggregation und Fibrillenbildung des IAPP und der Ausbildung der damit einhergehenden Erkrankung Typ II Diabetes mellitus. Nager (Abb. 1.6, grüner Kasten), deren IAPP-Sequenz ebenfalls eine hohe Analogie aufweist, zeigen hingegen keine Aggregation ihres IAPP und somit auch keine daraus erfolgende Diabetes Erkrankung. Die Amyloidogenität und Zytotoxizität des IAPP ist somit stark spezie- und sequenzabhängig [20,39,80]. Die Sequenz des Ratten- oder Mäuse-IAPP (rIAPP bzw. mIAPP, identische Peptidsequenz) unterscheidet sich in lediglich sechs der 37 Aminosäuren von der Sequenz des hIAPP, wobei fünf dieser sechs Aminosäuren in der zur Amyloidogenese wichtigen Region zwischen den Aminosäureresten 20 bis 29 liegen. Wiederum drei dieser fünf Reste im rIAPP sind Prolinreste, die als β -Faltblattbrecher bekannt sind (Abb. 1.6, rot). Auch weitere Nager, wie Meerschweinchen, Hamster und Kaninchen, besitzen die β -faltblattbrechende Aminosäure Prolin in diesem Sequenzbereich. Dieses Wissen wurde in der pharmazeutischen Forschung bereits in der Entwicklung des Medikamentes SYMLIN[®] (Amylin Pharmaceuticals LLC) umgesetzt, welches als Zusatz zur Diabetestherapie eingesetzt wird und eine Reduktion der Kalorienaufnahme und der Dauer der Mahlzeiten bei Patienten bewirkt (vgl. Kapitel 1.3.2). Der entsprechende Wirkstoff Pramlintid, ein hIAPP-Analogon, besitzt eine Substitution dreier Aminosäuren an den Positionen 25, 28 und 29 durch Prolin, sodass es an diesen Stellen dem nicht-amyloidogenen rIAPP entspricht und nicht zur Aggregation in der Lage ist [65]. Ein vollständiges Zusammenbringen der *in vitro* ermittelten Strukturen mit den Zytotoxizitätsmechanismen *in vivo* ist heute allerdings immer noch sehr schwierig, wäre aber von größter Bedeutung für die Behandlung von Typ II Diabetes mellitus und die Entwicklung neuer Medikamente.

1.4 Biologische Lipidmembranen

Biologische Membranen in Form der Plasmamembran, aber auch als intrazelluläre organellenumschließende Membranen, spielen eine wichtige Rolle im Verlauf der Aggregation und Zytotoxizität des hIAPP und somit im Zusammenhang mit der Entwicklung des Typ II Diabetes mellitus (vgl. Kapitel 1.3.3). Die Untersuchung der Wechselwirkung von hIAPP mit isolierten zellulären Membranen stellt ein wichtiges Thema dieser Arbeit dar. Daher soll in diesem Kapitel kurz auf die wichtigsten und im Zusammenhang mit den durchgeführten Isolations- und Charakterisierungsstudien zellulärer Membranen relevanten Eigenschaften biologischer Membranen eingegangen werden.

1.4.1 Lipidklassen in biologischen Membranen

Bei biologischen Membranen handelt es sich um quasi-zweidimensionale Flüssigkeiten; die Membranlipide lagern sich in der Regel zu semipermeablen Lipiddoppelschichten einer Dicke von 4 bis 5 nm zusammen, in die Proteine als integrale oder periphere Bestandteile integriert sind (Flüssig-Mosaik-Modell nach SINGER und NICOLSON [81]). Diese Lipidmembranen erfüllen eine Reihe von Funktionen in biologischen Zellen, von denen die wahrscheinlich Wichtigste die Abgrenzung der Zelle selbst vom umgebenden Milieu und die Organisation spezifischer Bereiche in Organellen ist. Darüber hinaus kommen zellulären Membranen aber auch weitere wichtige Rollen, beispielsweise bei Transportprozessen, der Energiegewinnung oder der Signalweiterleitung, zu [82]. Abhängig vom Zelltyp und der Funktion der jeweiligen Zellmembran variiert dabei das Verhältnis von Lipiden zu Proteinen in der Membran stark, wobei der Lipidgehalt zwischen 20 und 80% liegen kann [81,83]. Auch bei der Zusammensetzung des Lipidanteils der biologischen Membranen handelt es sich um ein heterogenes Gemisch verschiedener Lipide, das zur chemischen und strukturellen Vielfalt der unterschiedlichen Membranen beiträgt [82,84–86]. An der Membranbildung sind dabei hauptsächlich die Lipidklassen der Glycerophospholipide, Phosphosphingolipide und Sterole beteiligt (Abb. 1.7), wobei Glycerophospholipide in den meisten eukaryotischen Membranen den Hauptanteil bilden [82,86].

Die starke Heterogenität der zellulären Membranen ist unter anderem begründet in der Variabilität der Phospholipide selbst (Abb. 1.7). Sowohl die Lipidkopfguppen der Glycerophospholipide als auch die der Phosphosphingolipide können in eukaryotischen Membranen typischerweise zwischen **Phosphatidylcholin (PC)**, **Phosphatidylethanolamin (PE)**, **Phosphatidylglycerol (PG)**, **Phosphatidylinositol (PI)**, **Phosphatidylserin (PS)** und Phosphorsäure (PA, *phosphatidic acid*) variieren. Dabei sind PC und PE zwitterionische Kopfguppen, die eine neutrale Nettoladung besitzen; bei PG, PI, PS und PA handelt es sich hingegen um nach außen negativ geladene Lipidkopfguppen. In den meisten biologischen Membranen überwiegt der Anteil an zwitterionischen Kopfguppen; in der Regel sind weniger als 30% der Kopfguppen negativ geladen [84]. Auch die Form der Lipide kann maßgeblich durch deren Kopfguppe bestimmt werden. Phospholipide, die in biologischen Membranen die zwitterionische Kopfguppe PE tragen, besitzen im Gegensatz zur üblichen zylindrischen Form der Lipide zumeist die Form eines Kegelstumpfes und können aufgrund dessen allein keine Lipiddoppelschicht ausbilden. Diese Eigenschaft des PE ist allerdings für Prozesse, wie die funktionelle Einbettung von Membranproteinen in die Lipiddoppelschicht oder für die Membranfusion, von entscheidender Bedeutung [82,86]. Auch die Fettsäureketten der Phospholipide tragen zur Heterogenität bei; sie sind in ihrer Länge, Sättigung (gesättigt, einfach

oder mehrfach *cis*-ungesättigt), Art ihrer Verknüpfung (ester- oder etherverknüpft) oder im Vorliegen als Lysolipid mit nur einer Fettsäurekette, sehr variabel [82,86].

Sterole bilden den Hauptteil der unpolaren Lipide in biologischen Membranen. Dabei stellt **Cholesterol** (Chol) das wichtigste Sterol in eukaryotischen Zellen dar (Abb. 1.7). Der Cholesterolgehalt in den Membranen variiert abhängig von der Funktion der entsprechenden Membran: in der Plasmamembran beträgt er etwa 20-50%, in den Membranen der Organellen dagegen weniger als 10% [82,86]. Da Cholesterol aus einer starren Grundstruktur besteht und sich zwischen die Fettsäureketten der Phospholipide einlagern kann, ist es in der Lage, die Fluidität der biologischen Membranen zu beeinflussen [82,85,86].

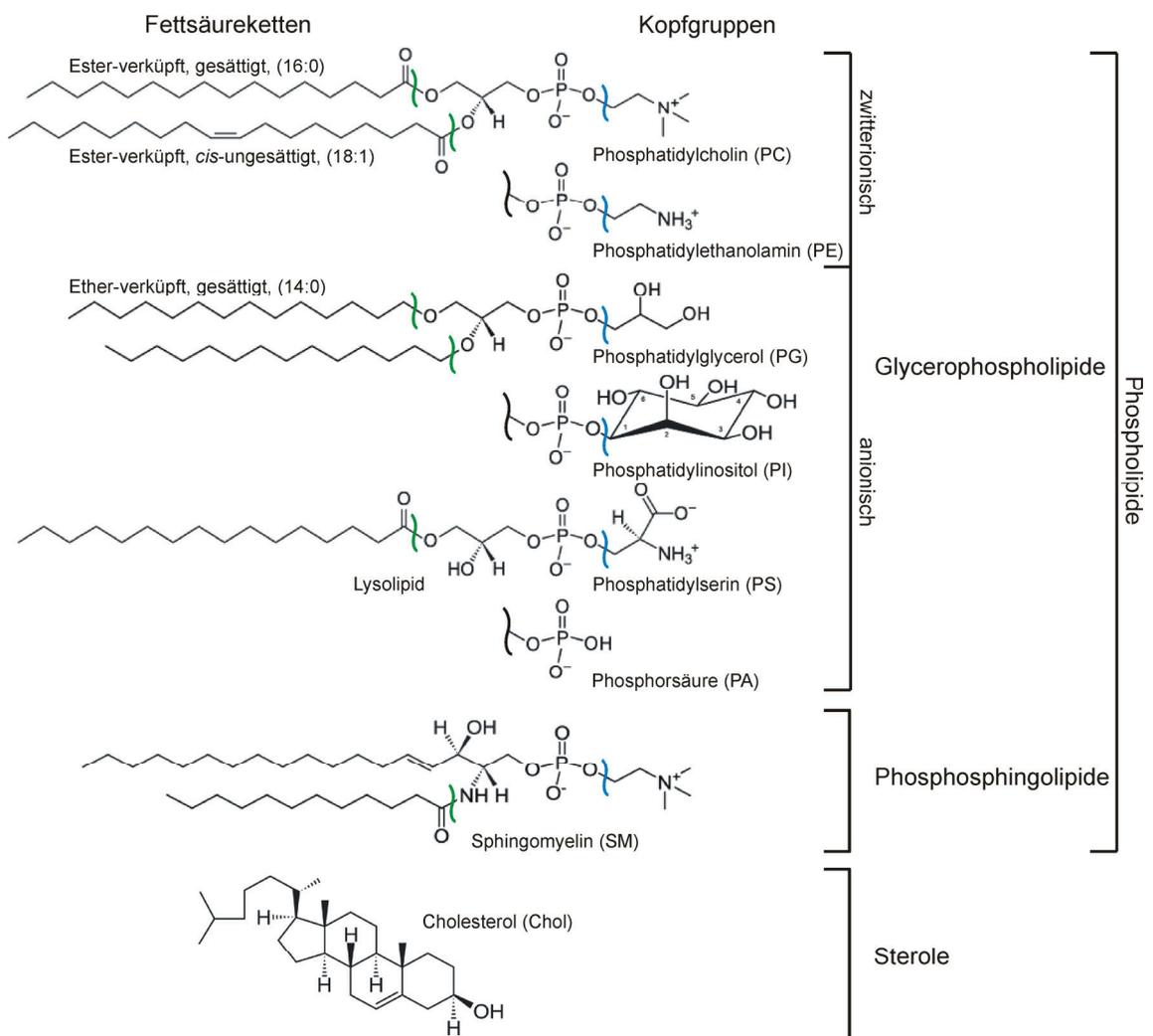


Abbildung 1.7: Struktureller Aufbau von Phospholipiden, unterteilt in Glycerophospholipide und Phosphosphingolipide, und Sterolen. Fettsäureketten (grüne Markierung) und Kopfgruppen (blaue Markierung) der Phospholipide sind variabel austauschbar.

Die Diversität der Membran liegt nicht ausschließlich in der Vielfalt der zur Verfügung stehenden Lipide begründet. Auch die Asymmetrie der inneren und äußeren Membranschicht und die Interaktion der Lipide miteinander, sichtbar im Phasenverhalten und der

Ausbildung sogenannter *lipid rafts*, tragen maßgeblich zur Heterogenität der biologischen Membranen bei [82,85,86].

1.4.2 Phasenverhalten von Lipiden

In einer Membran können in Abhängigkeit von ihrer Lipidzusammensetzung sowie von den Umgebungsbedingungen – Temperatur und Druck – unterschiedliche Lipidphasen vorherrschen. Diese bestimmen wesentliche Eigenschaften der Membran, wie Durchlässigkeit, Fusionsneigung und Affinität zur Proteinbindung. Bei zellulären Membranen handelt es sich in der Regel um Phospholipiddoppelschichten, die lamellare Phasen ausbilden (Abb. 1.8). Für eine optimale physiologische Funktion der biologischen Membran ist der fluide Zustand, beispielsweise in Form der flüssig-ungeordneten l_d -Phase (*liquid disordered*, auch flüssig-kristalline L_α -Phase), Voraussetzung; hier ist der laterale Diffusionskoeffizient und damit die Beweglichkeit der Lipide am größten. Darüber hinaus zeichnet sich die l_d -Phase auch durch eine hohe Beweglichkeit der Lipidalkylketten, welche auf einen hohen Anteil an *gauche*-Isomeren zurückzuführen ist, aus. Bei niedrigen Temperaturen oder hohen Drücken erfolgt eine Lipidphasenumwandlung dieser l_d -Phase in eine der hoch geordneten Gelphasen (*solid ordered*, s_o -Phasen), die in L_β^- , P_β - und L_c -Phase unterteilt sind. Diese Umwandlung führt zur deutlichen Veränderung der Ordnung des Lipidsystems, im Speziellen der translatorischen (Reduktion des lateralen Diffusionskoeffizienten, D_T , der Lipide) und konformationellen (Erhöhung des *trans/gauche*-Verhältnisses und damit des Ordnungsparameters, S , der Lipidalkylketten) Ordnung. Auch die Dicke der Lipiddoppelschicht ändert sich in den Gelphasen; sie ist größer als in der l_d -Phase, da durch die Bildung mehrerer Rotationsisomere in den Lipidalkylketten die Kettenlänge in der l_d -Phase reduziert wird [82,87].

Die vorherrschende Lipidphase wird nicht nur durch Umgebungsbedingungen, sondern zum großen Teil auch von der Zusammensetzung des Lipidsystems beeinflusst. So sind beispielsweise die langen gesättigten Alkylketten des **Sphingomyelins** (SM) für gelartige Phasen in SM-reichen Membranen verantwortlich und mehrfach ungesättigte Kohlenwasserstoffketten von Lipiden initiieren l_d -Phasen [82]. Biologische Membranen bestehen jedoch nicht nur aus Phospholipiden. Ein wichtiger Bestandteil sind ebenfalls Sterole, vor allem das Cholesterol. Allein ist es nicht in der Lage, eine Lipiddoppelschicht auszubilden, zusammen mit Phospholipiden kann es allerdings zur Ausbildung einer flüssig-geordneten l_o -Phase (*liquid ordered*) kommen (Abb. 1.8). Das Besondere an dieser Lipidphase ist, dass sie die hohe konformationelle Ordnung einer Gelphase, aber auch die hohe translatorische Beweglichkeit einer fluiden Phase besitzt. Darüber hinaus treten ab einer Konzentration von einigen mol% Cholesterol in einer Phospholipidmembran Entmischungserscheinungen mit Koexistenz zweier fluider

Phasen – flüssig-geordnete (l_o) und flüssig-ungeordnete (l_d) Phase – auf [82,87]. Die cholesterol-reichen l_o -Phasen werden dabei als *lipid rafts* bezeichnet (Abb. 1.8). Für einen Reihe von Modellmembranen konnte diese Phasenseparation in verschiedene Lipiddomänen variabler Zusammensetzung und mit unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften experimentell gezeigt werden [88–91]. Die physiologische Relevanz dieser *lipid rafts* in biologischen Membranen *in vivo* wird kontrovers diskutiert. Es mehren sich allerdings die Erkenntnisse, dass transiente dynamische Lipiddomänen im Nanometermaßstab, die reich an Sphingolipiden, Cholesterol und lipidverankerten Proteinen sind, auch in zellulären Membranen existieren und eine entscheidende Rolle beispielsweise in der proteinvermittelten Signalweiterleitung spielen [91–97].

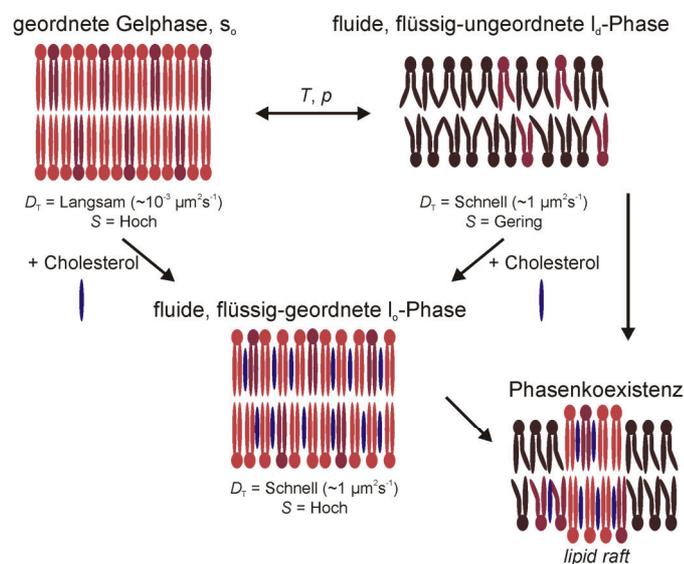


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung verschiedener lamellarer Lipidphasen. Phospholipide mit langen, gesättigten Lipidalkylketten bilden bei tiefen Temperaturen oder hohen Drücken meist geordnete Gelphasen (s_o). Ungesättigte Lipidalkylketten der Phospholipide, hohe Temperaturen und niedrige Drücke führen in biologischen Membranen zu fluiden, flüssig-ungeordneten Phasen (l_d). Die Anwesenheit von Sterolen in Phospholipidmembranen hat die Ausbildung fluiden, flüssig-geordneter Phasen (l_o) und die Separation der Phasen (Phasenkoexistenz) unter Bildung von *lipid rafts* zur Folge.

Der Status biologischer Membranen bezüglich ihres Phasenverhaltens hängt somit empfindlich von der Zusammensetzung der Art der Lipide in der Membran, sowie von den Kettenlängen und dem Sättigungsgrad der Lipidalkylketten der Phospholipide ab. Folglich ist es den Zellen möglich, unter verschiedensten Umweltbedingungen durch Variation der Membranzusammensetzung, z.B. durch den Einbau *cis*-ungesättigter Alkylketten oder von Cholesterol, den fluiden Zustand der Zellmembran aufrecht zu erhalten.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Insel-Amyloid-Polypeptid und seine durch Aggregation und Fibrillenbildung ausgelöste Toxizität gegenüber pankreatischen β -Zellen bilden die wahrscheinliche Ursache des Typ II Diabetes mellitus. Aus diesem Grund ist es für das Verständnis des Krankheitsbildes und die Entwicklung möglicher therapeutischer Ansatzpunkte von essentieller Bedeutung, ein detailliertes Bild des Aggregationsverhaltens von hIAPP in seiner physiologischen Umgebung zu erlangen. Um dies zu erzielen, muss der individuelle Einfluss jeglicher biologisch relevanter Komponenten, wie zellulärer Lipidmembranen, physiologischer Interaktionspartner aber auch der Lösungsumgebung, auf die Aggregation und die damit einhergehende Zytotoxizität des hIAPP studiert werden.

In diesem Zusammenhang erfolgt im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Bearbeitung verschiedener Projekte mit den folgenden Zielen:

1. Zu Beginn sollen zelluläre Lipide aus pankreatischen β -Zellen isoliert und ihre Lipidzusammensetzung charakterisiert werden. Aus diesen Lipiden hergestellte Membranen werden anschließend bezüglich ihres Phasenverhaltens analysiert. Darauf aufbauend wird die Wechselwirkung des hIAPP mit diesen komplexen, biologisch relevanten Lipidmembranen im Vergleich zur Interaktion mit einfachen Modellmembranen untersucht, da hIAPP von pankreatischen β -Zellen sekretiert und seine Toxizität potentiell auf die Permeabilisierung deren Lipidmembranen zurückzuführen ist.
2. In einem weiterführenden Projekt sollen die molekularen Grundlagen der Kreuzinteraktion von hIAPP und Amyloid β , einem ebenfalls amyloidogenen und mit der Alzheimerkrankheit assoziierten Polypeptid, in Anwesenheit der isolierten pankreatischen β -Zellmembran bestimmt werden. Da zwischen den Proteinaggregationskrankheiten Typ II Diabetes mellitus und Alzheimer in klinischen Studien ein Zusammenhang ermittelt wurde, sollen gemeinsame Veränderungen der Sekundärstrukturen der zugrundeliegenden Peptide sowie die Morphologie der gebildeten Fibrillen untersucht werden. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf dem Permeabilisierungsverhalten gegenüber komplexen zellulären Membransystemen.

3. Die Serum Amyloid P Komponente ist ein bei Patienten verschiedener Proteinaggregationserkrankungen häufig in amyloiden Ablagerungen detektiertes Protein. Ihr Einfluss auf das Aggregationsverhalten des hIAPP soll unter Berücksichtigung einer möglichen Rolle der Serum Amyloid P Komponente als Chaperonprotein untersucht werden.
4. Das sogenannte makromolekulare Crowding im Zytosol biologischer Zellen kann durch den Einsatz von hohen Konzentrationen an Polysacchariden (Ficoll und Dextran) oder globulären Proteinen (Bovines Serum Albumin und Lysozym) in Lösung simuliert werden. Die Wechselwirkung dieser Crowder mit dem hIAPP und die Auswirkungen des Crowdings auf die Aggregation, Fibrillenbildung und Toxizität sollen in einem weiteren Projekt untersucht werden, um Rückschlüsse auf das Verhalten des hIAPP innerhalb der biologischen Zelle ziehen zu können.
5. Weiterhin soll der Einfluss der molekularen Interaktion von Kosolvenzien, wie Trimethylamin-*N*-oxid, Betain und Harnstoff, auf die Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP ermittelt werden. Diese zellulär als Osmolyte vorkommenden Moleküle können stabilisierend oder destabilisierend auf Polypeptide wirken und üben dementsprechend möglicherweise gegensätzliche Effekte auf hIAPP aus.
6. In einem abschließenden Projekt werden kleine potentielle Inhibitormoleküle auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber der Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP analysiert, mit dem Ziel, wirkstoffähnliche Moleküle, die die toxische Oligomerbildung des hIAPP verhindern, zu identifizieren.

Das übergeordnete Ziel aller Einzelprojekte ist es somit, die unterschiedlichen Wechselwirkungen, denen hIAPP in der biologischen Zelle ausgesetzt ist, zu ermitteln und aufzuklären, in welcher Weise diese das Aggregationsverhalten des hIAPP in seiner physiologischen Umgebung gemeinsam beeinflussen.

2

BIOPHYSIKALISCHE METHODEN UND DEREN DURCHFÜHRUNG

2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (MSC-Advantage, Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Medien, Reagenzlösungen, Materialien und Geräte verwendet. Die Kultivierung der Zelllinie INS-1E (Tab. 2.1) erfolgte unter befeuchteter, 5% CO₂-haltiger Luft bei 37 °C in einem Inkubationsschrank (HERAcell 150, Thermo Fisher Scientific Inc.). Ihre Zellzahl wurde mittels einer NEUBAUER-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop (vgl. Kapitel 2.6.1) bestimmt.

Tabelle 2.1: Zelllinien und Zellkulturreagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
INS-1E	AG Prof. Dr. P. Maechler (Université de Genève, Schweiz) [98]
RPMI 1640 (+ 2 mM L-Glutamin)	Gibco®, Life Technologies Inc.
Fetales Kälberserum	PAA, GE Healthcare Inc.
HEPES	AppliChem GmbH
Natriumpyruvat	AppliChem GmbH
2-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH
Penicillin	AppliChem GmbH
Streptomycin	AppliChem GmbH
0,05% Trypsin/EDTA	Gibco®, Life Technologies Inc.

2.1.1 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinie INS-1E

Bei der Zelllinie INS-1E handelt es sich um insulinsekretierende β -Zellen aus den LANGERHANSschen Inseln des Pankreas der Ratte (Abb. 2.1). Diese Zelllinie wurde von

der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. P. Maechler (Universität de Genève, Schweiz) aus Kulturen der Mutterzelllinie INS-1, die aus einem strahlungsinduzierten Insulinom der NEDH-Ratte gewonnen wurde, isoliert und zur Verfügung gestellt [98,99]. Die Kultivierung der INS-1E-Zellen erfolgte in komplexem Medium, bestehend aus dem Grundmedium RPMI 1640 (+ 2 mM L-Glutamin) ergänzt mit 5% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 100 U/mL Penicillin und 100 μ g/mL Streptomycin. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (*cell culture flask, tissue-culture treated polystyrene, canted neck, plug-seal cap*, BD FalconTM) kultiviert und einmal pro Woche bei einer Konfluenz von etwa 80% mit einer 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung passagiert. Die Aussaatdichte in 25 mL frischem Medium betrug etwa $3 \cdot 10^6$ Zellen pro 75 cm² Kulturflasche bzw. $4 \cdot 10^4$ Zellen/cm². Jeweils drei Tage nach der Passage wurde ein Wechsel des Mediums vorgenommen.

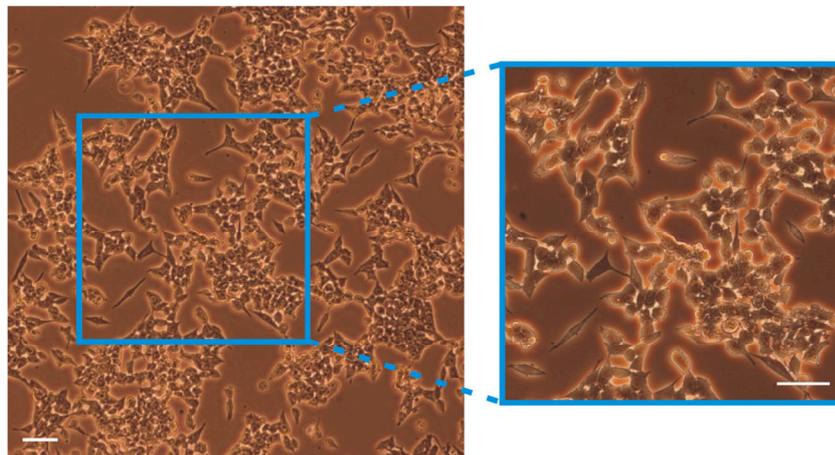


Abbildung 2.1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der verwendeten eukaryotischen Zelllinie INS-1E. Ein Übersichtsbild sowie eine entsprechende Vergrößerung sind bei etwa 80% Konfluenz gezeigt. Die Maßstäbe entsprechen 50 μ m.

2.1.2 Zytotoxizitäts-Assay

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung verschiedener IAPP-Spezies auf die Zelllinie INS-1E wurde ein Zytotoxizitäts-Assay auf Basis des WST-1-(*water soluble tetrazolium 1*)-Zellproliferations-Assays durchgeführt. Dazu wurden INS-1E-Zellen mit den entsprechenden IAPP-Formen behandelt, bevor ihre metabolische Aktivität mittels des WST-1-Zellproliferations-Assays ermittelt wurde. Metabolisch aktive Zellen reduzieren das bei diesem Assay eingesetzte Tetrazoliumsalz WST-1 mit Hilfe zellulärer Enzyme über einen komplexen Mechanismus, der vor allem extrazellulär an der Plasmamembran stattfindet, zu einem Formazanderivat (Abb. 2.2). Diese Bioreduktion ist hauptsächlich von der glykolytischen NAD(P)H-(Nicotinamidadenin-dinukleotid(phosphat), reduzierte Form)-Produktion der lebenden Zellen abhängig [100]. Somit korreliert der Anteil an metabolisch aktiven Zellen direkt mit der Menge

an produziertem Formazanderivat. Im Gegensatz zum Tetrazoliumsalz weist das Formazanderivat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm auf, dessen Intensität zur Quantifizierung des gebildeten Formazans UV/Vis-spektroskopisch verfolgt werden kann.

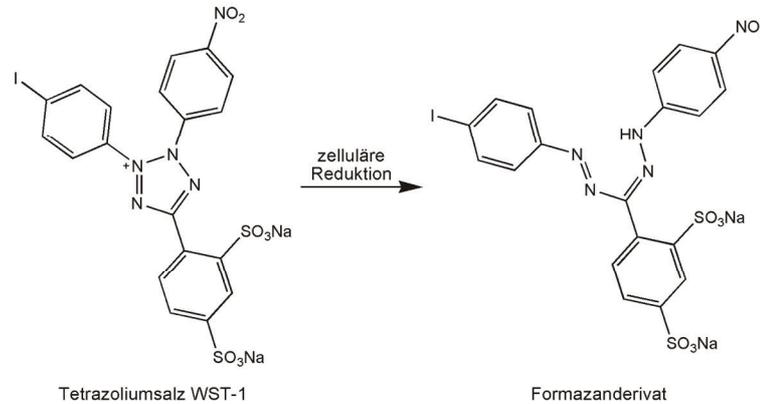


Abbildung 2.2: Mechanismus der zellulären Reduktion des beim Zytotoxizitäts-Assay eingesetzten Tetrazoliumsalzes WST-1.

Experimentelle Durchführung

Die INS-1E-Zellen wurden, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, kultiviert, im Anschluss an eine Passage mit frischem Medium auf eine Konzentration von 10^5 Zellen/mL gebracht und zu je 100 μ L in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (*MICROTESTTM Tissue Culture Plate, 96 Well, Flat Bottom with Low Evaporation Lid*, BD FalconTM) ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 100 μ L der zu testenden IAPP-Lösung in Kulturmedium behandelt. Diese IAPP-Lösung wurde nach erneuter 24-stündiger Inkubation entfernt und die Zellen mit frischem Medium gewaschen. Das WST-1-Reagenz (*Cell Proliferation Reagent WST-1*, Roche) wurde zunächst 1:4 mit PBS-Puffer (3,6 mM Na_2HPO_4 , 2,8 mM NaH_2PO_4 , 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,0) und 1:10 mit Kulturmedium verdünnt, bevor die Zellen für 24 h mit 100 μ L dieser WST-1-Lösung behandelt wurden. Die Absorption des entstandenen Formazanderivats wurde bei 450 nm (Referenzmessung bei 620 nm) mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Spektrophotometers (Infinite M200, Tecan) ausgelesen. Als Kontrollen wurden die Zellen sowohl mit reinem Medium anstelle der IAPP-Lösung sowie mit den verwendeten Pufferlösungen (ohne IAPP) behandelt. Die dabei ermittelten Daten wurden als Werte für 100% INS-1E-Zellviabilität angesehen. Eine Bestimmung der Hintergrundintensität erfolgte unter gleichen Bedingungen in Kavitäten ohne INS-1E-Zellbewuchs. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel (Microsoft Inc.) und Origin (OriginLab Inc.).

2.2 Lipide

2.2.1 Isolation zellulärer Lipide

Um zur Untersuchung der Wechselwirkung von hIAPP mit Lipidmembranen auf ein möglichst biologisch relevantes System zurückgreifen zu können, wurden die natürlichen zellulären Lipide der Zelllinie INS-1E isoliert.

2.2.1.1 Chloroform/Methanol-Extraktion

Die Lipidextraktion aus Geweben und Zellsuspensionen mit Hilfe einer Chloroform/Methanol-Mischung wurde bereits 1959 von BLIGH und DYER publiziert [101]. Bei diesem Verfahren werden Chloroform, Methanol und die wässrige Gewebe- oder Zellsuspension zunächst in einem Volumenverhältnis von 1:2:0,8 (Abb. 2.3, Punkt P) eingesetzt, sodass ein Einphasen-System entsteht. In dieser homogenen Lösung ist eine optimale Löslichkeit der zellulären Lipide gegeben. Die Separation in zwei Phasen erfolgt anschließend durch die Zugabe weiterer Volumina an Chloroform (Punkt Q) und Wasser (Punkt R). Die Methanol/Wasser-Phase enthält nun alle wasserlöslichen Komponenten und die Chloroform-Phase die hydrophoben Lipide, aber auch andere Komponenten, wie z. B. Membranproteine, Kohlenhydrate und Salze.

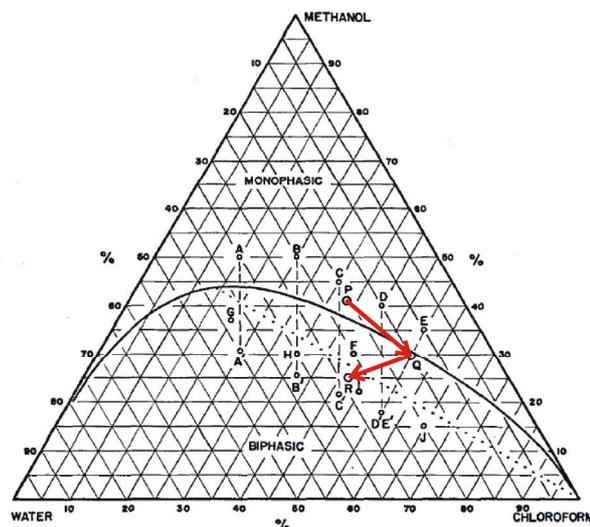


Abbildung 2.3: Chloroform/Methanol/Wasser-Phasendiagramm in % (w/w) bei 20 °C. Die Punkte P, Q und R sowie die roten Pfeile stellen die Zusammensetzung und Änderung der Mischung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Extraktion dar. Modifizierter Nachdruck aus Ref. [101]*.

Aus diesem Grund wurde diese ursprüngliche Extraktionsmethode nach BLIGH und DYER dahingehend modifiziert, dass zunächst zur Verbesserung der Ausbeute die Extraktion der wässrigen Phase mit reinem Chloroform wiederholt wurde. Um die

*Reproduced with permission from Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959) A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917 © 2008 Canadian Science Publishing or its licensors.

Extraktion anderer Nicht-Lipidkomponenten zu verringern, wurde außerdem ein abschließender Waschschrift der vereinigten organischen Phasen mit einer wässrigen KCl-Lösung durchgeführt [102]. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist die schnelle und relativ einfache Durchführbarkeit. Seine Limitierung liegt allerdings in der unspezifischen Isolation aller Zellmembranlipide, unabhängig davon welches Kompartiment der Zelle die Membranen, aus denen diese Lipide stammen, umschlossen hatten.

Experimentelle Durchführung

Zur Isolation der Gesamtheit aller Lipide aus den Zellmembranen der Zelllinie INS-1E mittels Chloroform/Methanol-Extraktion müssen diese Zellen zunächst geerntet und aufgeschlossen werden. Dazu wurden die Zellen, welche in einer 75 cm² Zellkulturflasche bis zur Konfluenz von ~80% gewachsen sind (vgl. Kapitel 2.1.1), zunächst zweimal mit 10 mL TBS-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen, anschließend mit 3 mL TBS-Puffer überschichtet und mit einem Zellschaber (BD FalconTM) geerntet. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Probenröhrchen überführt und für 5 min bei 450 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in Milli-Q-H₂O (800 µL pro verwendeter Zellkulturflasche) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einem 2 mL Dounce Homogenisator (Kimble Chase Life Science and Research Products LLC.) durch 60-maliges Auf- und Abschieben der Pistille aufgeschlossen. In der weiteren Beschreibung der experimentellen Durchführung wird die nun vorliegende, aufgeschlossene Zellsuspension als wässrige Lipidlösung bezeichnet.

Die Chloroform/Methanol-Extraktion wurde entsprechend des verwendeten Volumens entweder in 8 mL Glasgefäßen mit Teflondeckel (für ein Volumen mit bis zu 800 µL Lipidlösung pro Glasgefäß) oder in 500 mL Scheidetrichtern (für ein Volumen mit bis zu 45 mL Lipidlösung pro Scheidetrichter) durchgeführt. Zur vorbereiteten wässrigen Lipidlösung wurden Chloroform und Methanol gegeben, sodass ein Volumenverhältnis von 0,8:1:2 entstand. Nach gutem Durchmischen der Lösungen wurde eine weitere Volumeneinheit (VE) Chloroform und 1 VE Milli-Q-H₂O hinzugefügt und wiederum gut durchmischt. Die untere Chloroform-Phase wurde abgetrennt, im Fall kleiner Volumina jeweils nach vorheriger Zentrifugation bei 450 g für 5 min, und in einem separaten Glasgefäß gesammelt. Zur verbliebenen wässrigen Phase wurde erneut 1 VE Chloroform gegeben, gut gemischt, die organische Phase wurde wiederum abgetrennt und mit der vorherigen Chloroform-Phase vereinigt. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss wurden 0,4 VE einer 1 M KCl-Lösung zu den vereinigten Chloroform-Phasen gegeben, gut gemischt und die obere wässrige Phase verworfen. Zur unteren organischen Phase wurden 0,4 VE Milli-Q-H₂O hinzugefügt und gut gemischt. Die untere finale Chloroform-Phase wurde abgetrennt und in einem

Glasgefäß gesammelt. Das Chloroform wurde zunächst am Rotationsverdampfer und anschließend unter einem Stickstoffstrom verdampft. Verbliebenes Lösungsmittel wurde durch Trocknen im Vakuum über Nacht entfernt.

2.2.1.2 Lipidquantifizierung

Die Quantifizierung der isolierten Zellmembranlipide erfolgte mit Hilfe eines modifizierten BARTLETT-Assays [103]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung der Stoffmenge an anorganischem Phosphat, welches in Phospholipiden enthalten ist. Bei diesem Assay werden die Lipide zunächst mit Perchlorsäure aufgebrochen, sodass das anorganische Phosphat frei vorliegt. Dieses wird anschließend durch Zugabe von Ammoniummolybdat zu Phosphomolybdänsäure umgesetzt. Durch die weitere Zugabe von 4-Amino-2-naphthyl-4-sulfonsäure (FISKE-SUBBAROW-Reduktionsreagenz) und Erhitzen der Lösung erfolgt die Reduktion zu einem blauen Komplex (Molybdänblau). Die Absorption des Molybdänblau-Komplexes kann UV/Vis-spektroskopisch bei 820 nm bestimmt werden. Da die Menge an entstandenem Molybdänblau-Komplex proportional zur Menge an anorganischem Phosphat ist, kann durch Vergleich mit der Absorption des gebildeten Komplexes aus einer Standard-Phosphatlösung die Stoffmenge an eingesetztem Phospholipid quantifiziert werden.

Da diese Methode auf der Bestimmung der Menge an anorganischem Phosphat beruht, liegt die Limitierung in der ausschließlichen Bestimmung der Konzentration an Phospholipiden; andere Lipidarten, wie z. B. Sterole, bleiben unberücksichtigt. Phospholipide bilden allerdings die größte Klasse an Lipiden in Zellmembranen, sodass mit dieser Art der Lipidquantifizierung eine gute Abschätzung der durch die Isolation gewonnenen Lipidmenge durchgeführt werden kann.

Experimentelle Durchführung

Zur Bestimmung der Stoffmenge an getrockneten Zellmembranlipiden wurden diese zunächst in 1 mL Chloroform gelöst. Anschließend wurden jeweils zwischen 50 und 100 μL dieser gelösten Lipide in ein 8 mL Glasgefäß aliquotiert. Das Chloroform wurde durch einen Stickstoffstrom verdampft und restliches Lösungsmittel durch Trocknen im Vakuum über Nacht entfernt. Zu den getrockneten Lipiden wurden anschließend jeweils 75 μL H_2O hinzugegeben. Zur Ermittlung der Stoffmenge an Lipidvesikeln in wässriger Lösung wurden direkt 75 μL dieser Lösung in ein 8 mL Glasgefäß aliquotiert. In beiden Fällen wurden die Lipide mit 400 μL 70%-iger Perchlorsäure bei 200 °C für 1,5 h im Ofen aufgeschlossen. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden 2,4 mL einer 0,44%-igen (w/v) Lösung von Hexaammonium-heptamolybdat-4-hydrat und 2,4 mL einer 2,5%-igen (w/v) Lösung des FISKE-SUBBAROW-Reduktionsreagenzes hinzu-

gegeben und gut gemischt. Nach dem Erhitzen der Probe für 10 min in siedendem Wasser wurde die Lösung auf Eis abgekühlt. Die Absorption des entstandenen Molybdänblau-Komplexes wurde spektroskopisch bei 820 nm mit Hilfe des UV/Vis-Spektrometers (Lambda 25, Perkin Elmer) gegen eine Referenz ohne Phosphat detektiert. Die Quantifizierung wurde jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt und erfolgte durch Vergleich mit einer Standardkurve, die aus einer Standard-Phosphatlösung (0, 20, 40, 60, 80 und 100 nmol) ermittelt wurde. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Programmes Origin (OriginLab Inc.).

2.2.1.3 Lipidanalyse

Zur Bestimmung der Zusammensetzung des isolierten Lipidsystems wurde eine massenspektrometrische Analyse durch das Kansas Lipidomics Research Center (Kansas State University, USA) vorgenommen. Für die isolierten Gesamtzelllipide der Zelllinie INS-1E wurde ein *routine animal polar lipid profiling* durchgeführt. Bei dieser Analyse wurde die Lipidmischung auf 352 verschiedene Lipidspezies der Arten Phosphatidylcholin (PC), LysoPC (LPC), etherverknüpftes PC (ePC), Sphingomyelin (SM), DihydroSM (DSM), Phosphatidylethanolamin (PE), LysoPE (LPE), etherverknüpftes PE (ePE), Ceramid-PE (Cer-PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), etherverknüpftes PS (ePS), Phosphorsäure (PA, *phosphatidic acid*) und Phosphatidylglycerol (PG) mit jeweils einer Variation unterschiedlicher Fettsäureketten untersucht.

Experimentelle Durchführung

Die isolierten Zellmembranlipide wurden in getrockneter Form in einer Menge von mindestens 100 µg pro Lipidprobe auf Trockeneis an das Kansas Lipidomics Research Center gesendet. Es wurden jeweils mindestens zwei Lipidproben aus mindestens zwei unabhängigen Extraktionsprozessen untersucht.

2.2.1.4 Quantifizierung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der isolierten Lipidmischung wurde über einen modifizierten BRADFORD-Assay [104] bestimmt. Dieser Assay beruht auf der Komplexbildung des verwendeten Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G 250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Proteinseitenketten. Daraus resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von etwa 465 nm in der ungebundenen, kationischen Form zu etwa 595 nm, wenn er durch die Komplexbildung mit Proteinen in seiner anionischen Sulfonatform stabilisiert wird. Diese Verschiebung des Absorptionsmaximums kann UV/Vis-spektroskopisch verfolgt werden, sodass durch Vergleich der ermittelten Absorptionen mit einer Standardkurve des Proteins BSA (Bovines Serumalbumin) der Proteingehalt bestimmt werden kann.

Experimentelle Durchführung

Zur Bestimmung des Proteingehalts der isolierten Lipidmischung wurden die getrockneten Zellmembranlipide zunächst in 1 mL Chloroform gelöst. Anschließend wurden jeweils 50-100 μL dieser gelösten Lipidmischung aliquotiert, das Chloroform durch einen Stickstoffstrom verdampft und restliches Lösungsmittel durch Trocknen im Vakuum über Nacht entfernt. Nach Zugabe von 200 μL Milli-Q- H_2O zur getrockneten Lipidmischung wurde diese zur Solubilisierung der Lipide und Proteine für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Um den Proteingehalt von Lipidvesikeln in wässriger Lösung zu ermitteln, wurden direkt 50-200 μL dieser Lösung aliquotiert. Der modifizierte BRADFORD-Assay erfolgte mit dem Reagenz Roti[®]-Nanoquant (Roth) nach Herstellerangaben und wurde mit Hilfe des UV/Vis-Spektrometers (Lambda 25, Perkin Elmer) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte jeweils als Doppelbestimmung durch den Vergleich mit einer BSA-Standardkurve. Die Datenanalyse erfolgte softwaregestützt durch das Programm Origin (OriginLab Inc.).

2.2.2 Vesikelpräparation

2.2.2.1 Große unilamellare Vesikel

Für einige der im Folgenden verwendeten Methoden, wie die FOURIER-Transform-Infrarot- und Fluoreszenzspektroskopie oder die Rasterkraftmikroskopie, wurden große unilamellare Vesikel (LUV, *large unilamellar vesicles*) benötigt. Diese können über verschiedene Verfahrensweisen, zum Beispiel über den hier beschriebenen Frier/Tau-Prozess mit anschließender Extrusion, generiert werden [105]. Bei diesem Verfahren wird von getrockneten Lipiden ausgegangen, die zunächst mit einer Pufferlösung hydratisiert werden. Dabei entstehen spontan multilamellare Vesikel (MLV), die eine heterogene Größenverteilung von 0,05-10 μm Durchmesser, ein sehr geringes eingeschlossenes Volumen von nur 0,5 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$ Lipid und eine ungleichmäßige Verteilung von Puffersalzen innerhalb und außerhalb der Vesikel aufweisen. Durch die anschließende Anwendung des Frier/Tau-Prozesses, wobei das Einfrieren in flüssigem Stickstoff und das Auftauen im Wasserbad bei einer Temperatur über der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide erfolgt, wird das eingeschlossene Volumen auf 5-10 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$ Lipid vergrößert, die Multilamellarität verringert und eine gleichmäßige Verteilung der Puffersalze erzielt [106]. Zur Herstellung absoluter Unilamellarität und einer homogenen Größenverteilung wird die Lipidmischung durch eine Polycarbonatmembran mit entsprechender Porengröße extrudiert [107].

Experimentelle Durchführung

Zur Herstellung von LUV aus den isolierten Zellmembranlipiden wurden die entsprechenden Lipidmischungen zunächst in Chloroform gelöst und die benötigte

Menge aliquotiert. Anschließend wurde das Chloroform durch einen Stickstoffstrom verdampft und restliches Lösungsmittel durch Trocknen im Vakuum über Nacht entfernt. Zum hergestellten Lipidfilm wurde die entsprechend benötigte Menge an Puffer gegeben, bevor das Gemisch für 15 min bei 65 °C im Ultraschallbad behandelt wurde. Fünf Frier/Tau-Zyklen, bestehend aus dem Einfrieren der Lipidlösung in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 65 °C, wurden durchgeführt, sodass nach abschließender Ultraschallbehandlung für 5 min bei 65 °C eine Lösung von MLV erhalten wurde. Mittels Extrusion (21-mal) durch eine Polycarbonatmembran (Whatman, Porendurchmesser: 100 nm) wurden daraus LUV erzeugt.

2.2.2.2 Riesige unilamellare Vesikel

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen werden deutlich größere Vesikel, sogenannte riesige unilamellare Vesikel (GUV, *giant unilamellar vesicles*) mit einem Durchmesser von 5-60 µm, benötigt. Eine der am häufigsten verwendeten Techniken zu deren Herstellung ist die Methode der Elektroformation [108]. Bei der Elektroformation wird ein sehr dünner Lipidfilm auf einem optisch transparenten, elektrisch leitenden mit Indium-Zinn-Oxid-beschichteten (*indium tin oxide (ITO)-coated*) Deckglas erzeugt. Nach dem Einbau dieses Deckglases in eine entsprechende Fluoreszenzmesszelle werden die Lipide mit Puffer hydratisiert und auf eine Temperatur, die über der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide liegt, gebracht. Anschließend wird eine sinusförmige Wechsellspannung, deren Frequenz- und Spannungswerte vom verwendeten Lipid- und Puffersystem abhängig sind, angelegt. Bei Anwendung dieser Methode bilden sich im Vergleich zu anderen Methoden, wie beispielsweise der schonenden Hydratisierung [109], relativ schnell GUV aus. Daher wird vermutet, dass die angelegte Wechsellspannung zur Überwindung der Lipid-Oberflächen-Wechselwirkung beiträgt und somit zu einer schnelleren Ablösung der Lipidschichten und Ausbildung der Vesikel führt [108].

Experimentelle Durchführung

Die Herstellung von GUV aus den isolierten Zellmembranlipiden der Zelllinie INS-1E zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse erfolgte über Elektroformation direkt in der Fluoreszenzmesszelle. Dazu wurde zunächst eine 2 mg/mL Lipidlösung, die 0,2 mol% des fluoreszenzmarkierten Lipids *N*-Rh-DHPE (*N*-(LissamineTM Rhodamine B sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, Molecular Probes[®], Life Technologies Inc., Stocklösung $c = 1$ mM in Methanol) enthielt, in Chloroform hergestellt. Ein Aliquot dieser Lösung (20 µL) wurde auf einem ITO-Deckglas (SPI Supplies/Structure Probe Inc.) über *Spin-Coating* bei 800 rpm für 1 min gespreitet und für mindestens 2 h im Vakuum getrocknet. Dieses mit Lipiden beschichtete sowie ein unbeschichtetes ITO-Deckglas wurden in eine Fluoreszenzmesszelle des Modells *Large*

Closed Bath Imaging Chamber RC-21B (Zellvolumen 358 μL , Warner Instruments Inc.) eingebaut und über ein Durchfluss-Temperierelement an der zugehörigen *Platform P-2* (Warner Instruments Inc.) befestigt. Die zusammengebaute Messzelle wurde mit dem entsprechenden Puffer, der bei anschließender Durchführung von Permeabilisierungs-Assays den wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 (ATTO-TEC GmbH) in einer Konzentration von 5 μM enthielt, gefüllt und auf 42 $^{\circ}\text{C}$ temperiert. Im Anschluss wurde für 2 h eine sinusförmige Niederfrequenz-Wechselspannung (10 Hz, 1,7 V) über einen Funktionsgenerator TG315 (Thurlby Thandar Instruments Ltd.) an die ITO-Elektroden angelegt, bevor die Temperatur langsam (1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) auf Raumtemperatur reduziert wurde. Enthielt der zur Elektroformation verwendete Puffer den Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 zur Visualisierung der internen Lösung der Vesikel bei Permeabilisierungs-Assays, wurde die Fluoreszenzmesszelle zur Entfernung des Farbstoffes aus der umgebenden Lösung mit etwa 2 mL des entsprechenden fluorophorlosen Puffers gespült. Die so erstellten Vesikel wurden nun für temperaturabhängige Studien der isolierten β -Zellmembran oder für Interaktionsstudien mit fluoreszenzmarkierten Peptiden (hIAPP-K-BODIPY FL, Fluorescein-A β , DAC-A β) herangezogen.

2.3 Peptide und Proteine

2.3.1 Bezeichnungen und Bezugsquellen

In der folgenden Tabelle 2.2 sind alle verwendeten Peptide und Proteine sowie deren Bezugsquellen aufgelistet.

Tabelle 2.2: Peptide und Proteine

Bezeichnung in dieser Arbeit	Herstellerbezeichnung	Bezugsquelle
hIAPP	Amylin, Human <i>Trifluoracetat-Salz</i>	Calbiochem [®] , EMD Millipore Inc.
hIAPP-K-BODIPY FL	hIAPP-K-BODIPY [®] FL	Peptide Specialty Laboratories GmbH
IAPP-GI	[(N-Me)G24, (N-Me)I26]-IAPP	AG Prof. Dr. A. Kapurniotu (Technische Universität München) [110]
rIAPP	Amylin (mouse, rat) <i>Trifluoracetat-Salz</i>	Bachem Holding AG
rIAPP-K-BODIPY FL	rIAPP-K-BODIPY [®] FL	Peptide Specialty Laboratories GmbH

Bezeichnung in dieser Arbeit	Herstellerbezeichnung	Bezugsquelle
A β	Amyloid β -Protein (1-40) <i>Trifluoracetat-Salz</i>	Bachem Holding AG
DAC-A β	(7-Diethylaminocoumarin-3-yl) carbonyl-Amyloid β -Protein (1-40)	Bachem Holding AG
Fluorescein-A β	Fluorescein-Amyloid β	Peptide Specialty Laboratories GmbH
Serum Amyloid P Komponente (SAP)	Serum Amyloid P Component, Human Serum	Calbiochem [®] , EMD Millipore Inc.
Bovines Serumalbumin (BSA)	Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Lysozym	Lysozyme from chicken egg white	Sigma-Aldrich Co. LLC.

2.3.2 Disaggregation der amyloidogenen Peptide

Um zu Beginn der Durchführung von Aggregationsexperimenten sicherzustellen, dass die verwendeten amyloidogenen Peptide IAPP, A β sowie deren Derivate im monomeren Zustand vorliegen, wurden die Peptide im Vorfeld der einzelnen Messungen disaggregiert. Dazu wurden die Peptide in einer Konzentration von je 0,5 mg/mL in 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) gelöst, für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die jeweils zur Messung benötigte Peptidmenge wurde aliquotiert und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff über Nacht lyophilisiert. Die Aggregationsexperimente wurden nun durch Zugabe der entsprechenden Menge an Puffer zu den frisch lyophilisierten Peptiden initiiert.

2.4 FOURIER-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-(IR)-Spektroskopie ist eine weitverbreitete Methode zur Aufklärung der Struktur und Dynamik von Biomolekülen. Im Bereich der Proteinanalytik bietet sie zum Beispiel die Möglichkeit, zeit-, temperatur- oder druckabhängige Studien an Proteinen durchzuführen und dabei die Änderung deren Sekundärstruktur im nativen, aggregierten oder entfalteten Zustand zu ermitteln. Auch der Einfluss von Temperatur und Druck auf das Verhalten von Lipidmembranen kann mittels IR-Spektroskopie studiert werden. Dies beruht auf der hohen Empfindlichkeit dieser Technik gegenüber der molekularen Struktur der Biomoleküle sowie deren Veränderung unter intra- und intermolekularen Einflüssen. Bei dieser Art der Spektroskopie kommt es zur Absorption der IR-Strahlung und Anregung der molekularen Schwingung einer Molekülbindung, wenn die Frequenz

des Lichts und der Schwingung übereinstimmen und außerdem ein permanentes elektrisches Dipolmoment vorhanden ist oder sich das Dipolmoment während der Schwingung ändert. Da die Schwingungsfrequenz und damit die Wahrscheinlichkeit der Absorption von der Stärke und Polarität der schwingenden Bindung abhängt, wird sie stark durch die intra- und intermolekulare Umgebung beeinflusst [111]. Somit findet sich der Einfluss von Molekülinteraktionen (Protein-Protein, Protein-Lipid) aber auch von Temperatur oder Druck in den Schwingungsfrequenzen der Bindungen des Biomoleküls und damit im gemessenen IR-Spektrum wieder.

Bei modernen IR-Spektrometern handelt es sich in der Regel um **FOURIER-Transform-Infrarot-(FTIR)-Spektrometer**. Das wesentliche Element eines FTIR-Spektrometers ist das Interferometer, zum Beispiel ein **MICHELSON-Interferometer** (Abb. 2.4), welches aus zwei senkrecht zueinander angeordneten Spiegeln – einem festen und einem beweglichen – und einem Strahlteiler besteht. Der einfallende Infrarotstrahl wird am Strahlteiler aufgespalten, sodass die eine Hälfte des Lichts zum festen Spiegel reflektiert und die andere Hälfte zum beweglichen Spiegel transmittiert wird. Durch den beweglichen Spiegel wird die Weglänge des einen Strahls variiert und es kommt bei der Rekombination der Strahlen am Strahlteiler, je nach optischer Wegdifferenz x (*optical path difference*, OPD), zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz.

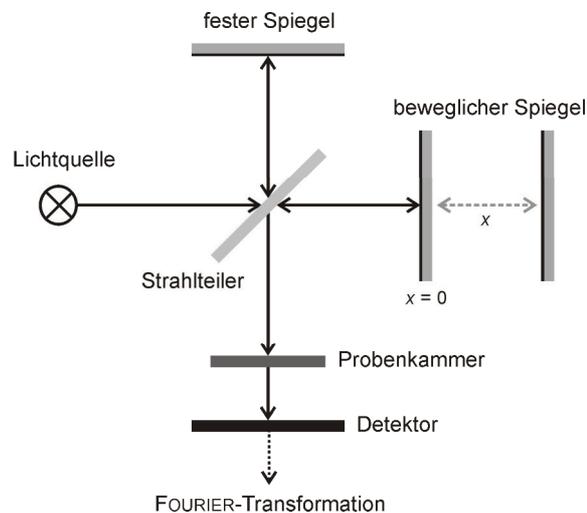


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers.

Die sogenannte *zero path difference* (ZPD) ist bei gleichem Abstand beider Spiegel vom Strahlteiler und somit bei einer Wegdifferenz von $x = 0$ erreicht. In diesem Fall und wenn die Wegdifferenz einem Vielfachen der Wellenlänge λ entspricht ($x = n\lambda$, $n = 0, 1, 2 \dots$), kommt es am Strahlteiler zur konstruktiven Interferenz und zur maximalen Intensität des Signals am Detektor. Im Gegensatz dazu interferieren die Strahlen destruktiv unter minimaler Signalintensität am Detektor bei einer optischen Wegdifferenz, die der Hälfte der Wellenlänge oder Vielfachen davon ($x = (n + \frac{1}{2})\lambda$) entspricht. Diese beiden Situationen stellen die Intensitätsextreme dar. Aufgrund der

Spiegelbewegung wird somit ein cosinusförmiges Intensitätsprofil I des IR-Strahls als Funktion der Wegdifferenz x mit

$$I(x) = 0,5 I_0 K (1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)) \quad (2.1)$$

für monochromatisches Licht erhalten. In dieser Gleichung steht $\tilde{\nu}$ für die Wellenzahl des IR-Strahls ($\tilde{\nu} = \lambda^{-1}$) und I_0 für die Intensität des einfallenden Lichts. Die gemessene Intensität ist im Allgemeinen noch von weiteren Faktoren, wie z. B. der Reflektivität bzw. Transmission des Strahlteilers oder der Empfindlichkeit des Detektors, abhängig. Diese Faktoren werden unter dem Korrekturfaktor K ($K = 1$ für ideale Systeme, sonst $K < 1$) zusammengefasst. Für polychromatisches Licht sind I_0 und K selbst Funktionen der Wellenzahl und werden zu $B(\tilde{\nu})$ zusammengefasst, sodass $I(x)$ analog zu Gleichung 2.1 durch

$$I(x) = \int_0^{\infty} 0,5 B(\tilde{\nu})(1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)) d\tilde{\nu} \quad (2.2)$$

mit $B(\tilde{\nu}) = I_0(\tilde{\nu}) K(\tilde{\nu})$ beschrieben werden kann. Bei großer optischer Wegdifferenz ($x \gg \lambda$) sind die Phasen der einzelnen Wellenzüge nahezu gleichmäßig verteilt, sodass sich die $\cos(2\pi\tilde{\nu}x)$ -Terme zu Null mitteln, welches durch $I(\infty)$ beschrieben und aufgrund fehlender spektroskopisch relevanter Informationen vernachlässigt werden kann. Somit ergibt sich die Interferogramm-Funktion $F(x)$ zu:

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} 0,5 B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) d\tilde{\nu}. \quad (2.3)$$

Die Überführung des gemessenen Interferogramms in die Wellenzahldomäne, d. h. die Ermittlung der spektralen Intensitäten $B(\tilde{\nu})$, erfolgt nun durch FOURIER-Transformation der Gleichung 2.3:

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} 0,5 F(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx. \quad (2.4)$$

Das nach der FOURIER-Transformation erhaltene Spektrum entspricht allerdings noch nicht dem Transmissionsspektrum der Probe. Vielmehr handelt es sich um ein Einstrahlspektrum (*single beam spectrum*), welches noch die unter dem Korrekturfaktor K zusammengefassten Einflussfaktoren enthält. Das Transmissionsspektrum $T(\tilde{\nu})$ einer Probe wird durch Division des Einstrahlspektrums der Probe $B(\tilde{\nu})$

durch das Einstrahlspektrum der Referenz $B_0(\tilde{\nu})$ erhalten; das Absorptionsspektrum $A(\tilde{\nu})$ entspricht dessen negativen dekadischen Logarithmus (Gleichung 2.5) [87,112]:

$$A(\tilde{\nu}) = -\lg T(\tilde{\nu}) = -\lg \left(\frac{B(\tilde{\nu})}{B_0(\tilde{\nu})} \right). \quad (2.5)$$

Zur Aufnahme von FTIR-Spektren gibt es verschiedene Techniken. Zum einen können Transmissionsmessungen (Kapitel 2.4.1) durchgeführt werden, zum anderen gibt es die Methode der abgeschwächten Totalreflexion (*attenuated total reflection*, ATR), die im Jahr 1961 erstmals von FAHRENFORT [113] beschrieben wurde und FTIR-Spektroskopie an Grenzflächen ermöglicht (Kapitel 2.4.2).

2.4.1 Transmissions-FTIR-Spektroskopie von Lipiden

Bei der Transmissions-FTIR-Spektroskopie wird das Infrarotlicht durch eine die Probe enthaltende Küvette aus zwei Fenstern (ZnSe, BaF₂, CaF₂ oder Diamant), die von einem Abstandhalter getrennt werden, geleitet, bevor es auf den Detektor trifft. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Art der Messtechnik hauptsächlich für die temperaturabhängige Charakterisierung des Phasenverhaltens isolierter Zellmembranen verwendet. Lipidmembranen weisen dazu eine Reihe charakteristischer IR-Banden auf. Dies sind vor allem die CH-Streckschwingungen der Phospholipide im spektralen Bereich von 3100 bis 2800 cm⁻¹. Dabei werden die antisymmetrischen und symmetrischen Methylenstreckschwingungen im Bereich von 2920 cm⁻¹ und 2850 cm⁻¹ beobachtet. Die Lage dieser Banden ist konformationsabhängig und kann zur qualitativen Bestimmung des *trans/gauche*-Konformationsverhältnisses der Alkylketten genutzt werden. Befinden sich die Methylengruppen in der *all-trans*-Konformation, liegt das Maximum der Bande der symmetrischen Methylenstreckschwingung bei etwa 2849 cm⁻¹. Bei einer Zunahme an *gauche*-Konformeren, z. B. durch einen Phasenübergang in eine Lipidphase mit geringerer Ordnung der Lipidalkylketten, kommt es zu einer Verschiebung des Maximums in Richtung höherer Wellenzahlen (bis ~2855 cm⁻¹). Die Lagen der Schwingungsbanden dieser und ausgewählter weiterer Gruppen der Alkylketten sind in Tabelle 2.3 aufgezeigt [87].

Tabelle 2.3: IR-Banden der CH-Streckschwingungen von Phospholipiden [87]

Wellenzahl $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Funktionelle Gruppe	Schwingung (Symbol)
3010	<i>cis</i> – CH = CH – (in ungesättigten Lipiden)	$\nu_{\text{as}}(\text{CH})$
2956	C – CH ₃	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2920	– (CH ₂) _n –	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2873	C – CH ₃	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
2850	– (CH ₂) _n –	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$

Experimentelle Durchführung

LUV aus den isolierten INS-1E-Zellmembranlipiden wurden, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, in einer Konzentration von 15 mg/mL hergestellt. Die temperaturabhängige Transmissions-FTIR-Spektroskopie der LUV wurde an einem FTIR-Spektrometer des Modells Nicolet 5700 (Thermo Electron Inc.) durchgeführt. Dieses Spektrometer enthält ein MICHELSON-Interferometer als Interferenzeinheit und einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-A (*mercury cadmium telluride*, Quecksilber-Cadmium-Tellur) Detektor. Um das Wasser-Hintergrundsignal möglichst gering zu halten, wird der Innenraum des Spektrometers kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Die Messungen wurden mit Hilfe einer temperierbaren Messzelle, bestehend aus zwei CaF₂-Fenstern, die durch einen 50 μm dicken Abstandhalter aus Mylar getrennt werden und ein Probenvolumen von $\sim 2,5 \mu\text{L}$ fassen, durchgeführt. Die Temperierung erfolgte mittels eines Flüssigkeitskreislaufs über einen Thermostaten und wurde von einem unmittelbar an der Messzelle angebrachten Temperaturfühler reguliert. Für alle Messungen wurden die in Tabelle 2.4 angegebenen Einstellungen gewählt.

Tabelle 2.4: Gewählte Einstellungen des Spektrometers zur *T*-abhängigen Transmissions-FTIR-Spektroskopie

<i>T</i> -abhängige Messungen der INS-1E-Zellmembranlipide	
Spektraler Bereich	4000-1111 cm^{-1}
Anzahl der Scans pro Spektrum	128
Spektrale Auflösung	2 cm^{-1} (Datenpunktabstand 0,964 cm^{-1})
Interferometergeschwindigkeit	1,8988 cm/s
Apodisierung	HAPP-GENZEL

Zu Beginn jeder Messreihe wurde das Spektrometer mit Hilfe der verwendeten Software OMNIC[®] (Thermo Electron Inc.) intern kalibriert. Die Blendenöffnung wurde dabei und während der folgenden Messungen maximal gewählt, um eine bestmögliche Intensität zu erzielen. Im Anschluss wurde jeweils ein Hintergrundspektrum ohne

Messzelle und Probe (Einstrahlspektrum der Referenz) aufgenommen, welches während der gesamten Messung als internes Referenzspektrum verwendet wurde. Außerdem wurden zur späteren Korrektur der Messergebnisse Pufferspektren aufgenommen. Die Auswertung der IR-Spektren erfolgte mit dem Programm GRAMS/AI™ Spectroscopy Software (Thermo Electron Inc.), die Darstellung der Ergebnisse mit Origin (OriginLab Inc.). Zur Auswertung der CH₂-Streckschwingungen der Phospholipide wurde zunächst das Pufferspektrum subtrahiert. Anschließend wurden die Banden im Bereich von 3030 cm⁻¹ bis 2800 cm⁻¹ ausgeschnitten und eine Basislinien- und *Offset*-Korrektur von 3030 cm⁻¹ bis 2810 cm⁻¹ durchgeführt. Die Bestimmung des Maximums der Wellenzahl der symmetrischen CH₂-Streckschwingung erfolgte mit Hilfe der Funktion *Peak Picking* der GRAMS/AI™ Spectroscopy Software.

2.4.2 ATR-FTIR-Spektroskopie von Peptiden

Bei der FTIR-Spektroskopie unter Ausnutzung der Methode der abgeschwächten Totalreflexion (*attenuated total reflection*, ATR) wird die Probe in einer ATR-Messzelle (Abb. 2.5) auf ein optisch transparentes internes Reflexionselement (IRE) aufgebracht. Ein solches IRE ist ein Einkristall, z. B. aus ZnSe, Ge oder Si, mit einem Brechungsindex n_1 , der höher als der Brechungsindex der Probe n_2 (bzw. n_3) ausfällt.

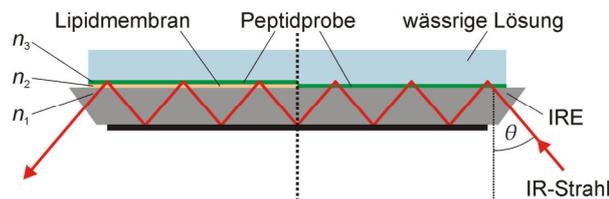


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Aufbaus einer ATR-Messzelle. Links ist die Anordnung für Messungen von Lipid-Peptid-Wechselwirkungen gezeigt, rechts der Aufbau für reine Peptidstudien.

Das Infrarotlicht wird in einem Einfallswinkel θ auf den Kristall gelenkt, der größer als der kritische Winkel θ_c ist, sodass es an der Kristall/Proben-Grenzfläche zur Totalreflexion kommt. Der kritische Winkel θ_c lässt sich dabei nach dem SNELLIUSSchen Brechungsgesetz zu

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (2.6)$$

berechnen. Da die Totalreflexion eine Beugungserscheinung ist, tritt der IR-Strahl in Form einer evaneszenten Welle in die Probenlösung mit geringerem Brechungsindex ein und aufgrund des GOOS-HÄNCHEN-Effekts [114] ein wenig versetzt wieder aus. Dabei ist die Strahlung an der Grenzfläche molekularer Absorption durch die Probe unterworfen, sodass der IR-Strahl nur in abgeschwächter Form reflektiert wird

(abgeschwächte Totalreflexion). Die Amplitude der elektrischen Feldstärke E der evaneszenten Welle fällt in der Probenlösung mit zunehmendem Abstand z von der Grenzfläche exponentiell ab. Diese abstandsabhängige Abnahme wird durch

$$E = E_0 e^{-z/d_p} \quad (2.7)$$

$$\text{mit } d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (2.8)$$

beschrieben, wobei E_0 die Amplitude der elektrischen Feldstärke an der Grenzfläche und d_p die Eindringtiefe der evaneszenten Welle darstellt. Die Eindringtiefe ist von den Brechungsindizes der beiden Medien sowie der Wellenlänge λ und dem Einfallswinkel θ der IR-Strahlung abhängig. Sie ist der Abstand von der Grenzfläche, bei dem das elektrische Feld auf e^{-1} des Ausgangswertes abgefallen ist [115,116]. Typische Werte der Eindringtiefe liegen bei 100-1000 Å. Die Absorption der Probe ist allerdings proportional zur effektiven Eindringtiefe der evaneszenten Welle d_e , die als

$$d_e = \frac{n_2}{n_1 \cos \theta} \int_0^{\infty} E^2 dz = \frac{n_2 E_0^2 d_p}{2n_1 \cos \theta} \quad (2.9)$$

definiert ist und Einflüsse der Wechselwirkung des evaneszenten Feldes mit der Probe berücksichtigt [116].

Der Vorteil der ATR-FTIR-Spektroskopie gegenüber der Messung in Transmission liegt darin, dass mit dieser Methode auch Wechselwirkungen an Grenzflächen beobachtet werden können, da der verwendete Kristall z. B. mit einer Lipidmembran beschichtet werden kann. So ist eine Analyse der Interaktion von Proteinen/Peptiden mit Membranen möglich. Die Adsorption des Probenmaterials an den ATR-Kristall und somit die Erhöhung der Konzentration im Bereich der evaneszenten Welle hat den weiteren Vorteil, dass wesentlich kleinere Probenkonzentrationen von nur 0,01% (w/w) gegenüber der Transmission (0,3% (w/w)) benötigt werden. Auch ist diese Methode relativ unempfindlich gegenüber Staubpartikeln und Luftblasen, da diese wie auch IR-aktive Gegenionen in Lösung verbleiben und nicht von der evaneszenten Welle erfasst werden. Ein Nachteil ist allerdings der im Vergleich zur Transmission sehr hohe Volumenbedarf an Probenmaterial von etwa 1 mL.

In dieser Arbeit wurde die ATR-FTIR-Spektroskopie verwendet, um die Interaktion des IAPP mit isolierten Zellmembransystemen, mit anderen Peptiden (A β) und Proteinen (SAP) in An- oder Abwesenheit von Lipidmembranen, und unter Einfluss von

Crowdern und Kosolvenzien zu untersuchen. Dazu weisen Proteine und Peptide mehrere charakteristische IR-Absorptionsbanden auf. Die Wichtigste stellt die Amid-I-Bande (Amid-I'-Bande für D₂O als Lösungsmittel) im spektralen Bereich von 1700 bis 1600 cm⁻¹ dar, der im Wesentlichen die Carbonylstreckschwingung des Peptidrückgrates zugrunde liegt. Da die C=O- und N-H-Gruppen der Proteine/Peptide an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in Sekundärstrukturen beteiligt sind, kann die Amid-I-Bande zu deren Analyse herangezogen werden [87,112]. Aus den diversen Sekundärstrukturmotiven der Proteine/Peptide, die an unterschiedlichen Positionen der Amid-I-Bande absorbieren, resultiert eine relativ breite Amid-I-Bande aus überlappenden Schwingungsmoden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente. Dies schließt die direkte Auswertung der Sekundärstruktur aus, sodass auf eine Verstärkung der Bandenauflösung zur Identifizierung von Subbanden und anschließende Kurvenanpassung zurückgegriffen werden muss. Diese Subbanden und deren Positionen können über zwei unabhängige mathematische Verfahren, die *FOURIER self deconvolution* (FSD) und die Bildung der zweiten Ableitung des Absorptionsspektrums, ermittelt werden [111,117–119]. Über empirische Regeln werden die ermittelten Subbanden den jeweiligen Sekundärstrukturelementen zugeordnet. Diese Zuordnungsregeln (Tab. 2.5) wurden durch Messung der Amid-I-Bande von Polypeptiden und Proteinen erhalten, deren Struktur hauptsächlich von einem der Sekundärstrukturelemente (z. B. α -Helix oder β -Faltblatt) dominiert wird. Informationen über die Sekundärstrukturanteile des vermessenen Peptids/Proteins werden nun durch eine Anpassung der gemessenen Amid-I-Bande mit VOIGT-Kurven erhalten, wobei jede dieser VOIGT-Kurven eine der ermittelten Subbanden und somit ein Sekundärstrukturmotiv repräsentiert [111,120].

Tabelle 2.5: Zuordnung der Wellenzahlbereiche zu den Sekundärstrukturmotiven der Peptide/Proteine in D₂O [87,121]

Wellenzahl $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	Zuordnung zum Sekundärstrukturmotiv
1615 - 1625	intermolekulare β -Faltblätter
1630 - 1640	intramolekulare β -Faltblätter
1640 - 1650	ungeordnete Strukturen
1650 - 1658	α -Helices
1660 - 1675	β -Schleifen
1680 - 1695	antiparallele β -Faltblätter (Bandensplittung*)

* Auftreten einer schwächeren Bande bei hohen Wellenzahlen zusätzlich zur Hauptbande

Diese Art der Zuordnung der Sekundärstrukturen besitzt jedoch einige Nachteile. Da die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Sekundärstrukturelemente nicht bekannt sind, kann die quantitative Angabe des Anteils jeder Sekundärstruktur fehlerbehaftet sein. Der mittels FTIR-Spektroskopie ermittelte Anteil an β -Faltblättern fällt beispielsweise

gegenüber dem mit hochauflösenden Verfahren ermittelten Anteil sehr häufig zu hoch aus. Allerdings liefert die Bestimmung relativer Änderungen der Struktur meist schon ausreichende Hinweise über mögliche Reaktionsmechanismen. Ein weiteres Problem stellt auch die Überlappung verschiedener Banden dar. Die IR-Banden der ungeordneten Strukturen überlappen aufgrund ihrer Breite beispielsweise häufig mit der Region, die den α -Helices zugewiesen wird. Des Weiteren kann es auch bei Proteinen mit hohem α -helikalen Anteil zu Fehlinterpretationen kommen, da bei Abwesenheit von β -Faltblättern trotzdem Banden im spektralen Bereich von $1640\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ präsent sein können. Diese Banden, die meist durch kurze, ungeordnete, verschiedene α -Helices verknüpfende Peptidsequenzen verursacht werden, könnten dann fälschlicherweise den β -Faltblättern zugeordnet werden [120].

Experimentelle Durchführung

Die ATR-FTIR Messungen wurden am Nicolet 6700 FTIR-Spektrometer (Thermo Electron Inc.) durchgeführt. Auch dieses Spektrometer enthält ein MICHELSON-Interferometer als Interferenzeinheit und einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-A Detektor. Um auch hier das Wasser-Hintergrundsignal möglichst gering zu halten, wurde der Innenraum des Spektrometers kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Es wurde eine ATR-Durchflusszelle aus Stahl der Firma Piketech verwendet, die durch einen Flüssigkeitskreislauf mit Hilfe eines Thermostaten temperiert wurde. Als internes Reflexionselement diente ein trapezoidaler Kristall aus Germanium oder Silizium (Piketech, $80 \times 10 \times 4\text{ mm}$, Einfallswinkel: $\theta = 45^\circ$), der mittels zweier O-Ringe aus Viton in die ATR-Messzelle eingebaut wurde. Für alle Messungen wurden die in Tabelle 2.6 angegebenen Einstellungen gewählt. Zu Beginn jeder Messreihe wurde das Spektrometer mit Hilfe der verwendeten Software OMNIC (Thermo Electron Inc.) intern kalibriert. Die Blendenöffnung wurde dabei so gewählt, dass das Interferogramm während der Kalibrierung nicht die maximal zulässige Intensität von 9,8 überschritt. Im Anschluss wurde jeweils ein Hintergrundspektrum mit aufgelegter leerer ATR-Messzelle (Einstrahlspektrum der Referenz) aufgenommen, welches während der gesamten Messung als internes Referenzspektrum verwendet wurde. Nachfolgend wurde zur späteren Korrektur der Messergebnisse ein Pufferspektrum bei 25 °C aufgenommen. Im Fall der Messung von Sekundärstrukturänderungen der Peptide in Abwesenheit von Lipidmembranen wurde nun die Pufferlösung durch eine, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, vorbereitete und frisch im entsprechenden Puffer gelöste Peptidlösung ersetzt. Die FTIR-Messung wurde nun unmittelbar für einen Zeitraum von 20-40 h (Aufnahme von Spektren alle 5 min) bei einer konstanten Temperatur von 25 °C gestartet. Sollte die Interaktion der Peptide mit einer Lipiddoppelschicht untersucht werden, wurde die Messzelle mit enthaltenem Puffer stattdessen auf eine Temperatur von $60\text{-}65\text{ °C}$ aufgeheizt. Anschließend wurde sie mit einer Lösung der

entsprechenden LUV ($c = 0,5 \text{ mg/mL}$, hergestellt wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben) befüllt und eine FTIR-Messung für 10 h zur Verfolgung des spontanen Spreitens der Lipide auf dem IRE gestartet. Etwa 10 min nach dem Start der Messung wurde der Thermostat auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ heruntergeregelt, um die ATR-Zelle langsam abzukühlen. In Lösung verbliebene Vesikel wurden im Anschluss durch Spülen der Membran mit 2 mL des entsprechenden Puffers (Fließgeschwindigkeit $\sim 1,4 \text{ mL/min}$) für 2 h über eine Peristaltikpumpe (Masterflex L/S, Easy-Load 3, Barnant Company) entfernt. Abschließend wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, die Peptidlösung injiziert und die Messung unmittelbar für einen Zeitraum von 20-40 h (Aufnahme von Spektren alle 5 min) bei einer konstanten Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gestartet.

Tabelle 2.6: Gewählte Einstellungen des Spektrometers bei der ATR-FTIR-Spektroskopie

	ATR-FTIR-Messungen
Spektraler Bereich	4000-650 cm^{-1} (Ge-Kristall) 4000-1500 cm^{-1} (Si-Kristall)
Anzahl der Scans pro Spektrum	128
Spektrale Auflösung	2 cm^{-1} (Datenpunktabstand 0,964 cm^{-1})
Interferometergeschwindigkeit	2,5317 cm/s
Apodisierung	Happ-Genzel

Die Auswertung der IR-Spektren erfolgte mit dem Programm GRAMS/AITM Spectroscopy Software (Thermo Electron Inc.), die Darstellung der Ergebnisse mit Origin (OriginLab Inc.). Lipidspektren wurden, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, korrigiert und analysiert. Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Adsorption der Lipide an das IRE wurde der Bereich von 3030 cm^{-1} bis 2810 cm^{-1} außerdem integriert. Zur Auswertung der Amid-I'-Bande wurde zunächst das letzte beim Waschen der Lipidschicht aufgenommene Spektrum und ein Spektrum des Wasserrauschens subtrahiert. Der spektrale Bereich von 1800 cm^{-1} bis 1504 cm^{-1} wurde ausgeschnitten und eine Basislinien- und *Offset*-korrektur im Bereich von 1710 cm^{-1} bis 1585 cm^{-1} durchgeführt. Falls erforderlich wurden die erhaltenen Spektren mit einer Glättungsfunktion (SAV-GOLAY) geglättet. Auch hier wurde zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Adsorption der Peptide an die Membran eine Integration des Bereiches von 1710 cm^{-1} bis 1585 cm^{-1} vorgenommen. Um eine Kurvenanpassung der Amid-I'-Bande durchführen zu können, wurden alle Spektren zunächst auf einen Flächeninhalt von 1 normiert. Anschließend wurde unter der Annahme, dass alle Sekundärstrukturkomponenten mit dem gleichen Extinktionskoeffizienten zur Amid-I'-Bande beitragen, eine Bandenanpassung mit VOIGT-Kurven durchgeführt. Dazu wurde die Lage und Anzahl der einzelnen Kurven durch die vorherige Verstärkung der Bandenauflösung durch *FOURIER self deconvolution* und Bildung der 2. Ableitung bestimmt. Nach

Festlegung der Startparameter (Lage, Anzahl und Halbwertsbreite der Subbanden) wurde die Amid-I'-Bande nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate unter Anwendung des Algorithmus von LEVENBERG und MARQUARDT als Linearkombination der Subbanden simuliert [122]. Da die Gesamtfläche unter der Amid-I'-Bande den Flächeninhalt 1 zugewiesen bekommen hat, repräsentiert der Flächeninhalt einer jeden Subbande nun den Anteil der ihr zugeordneten Sekundärstruktur an der Gesamtstruktur des Peptids.

2.5 Fluoreszenzspektroskopie (Thioflavin T Assay)

Auch die Fluoreszenzspektroskopie kann verwendet werden, um die Struktur und Dynamik von Biomolekülen, wie Proteinen oder Lipiden, in Lösung zu untersuchen. Aufgrund der hohen Sensitivität und Selektivität ermöglicht sie die Analyse selbst geringster Probenmengen bei einer Zeitauflösung bis in den Nanosekundenbereich. Zusätzlich zur Verwendung der intrinsischen Fluoreszenz der Biomoleküle (z. B. der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan in Proteinen) gibt es eine große Anzahl an speziell entwickelten extrinsischen Fluorophoren für eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Das Prinzip der Fluoreszenz beruht dabei auf der Desaktivierung eines elektronisch angeregten Molekülzustandes eines Fluorophors unter der Emission eines Photons. Die Fluoreszenzlebensdauer, d. h. die mittlere Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verweilt, bevor er in den Grundzustand relaxiert, beträgt dabei etwa 10^{-8} s und ist damit im Vergleich zum Prozess der Absorption (10^{-15} s) relativ lang. Aus diesem Grund kann die Wechselwirkung des Fluorophors im angeregten Zustand mit seiner Umgebung verschiedene Prozesse, wie z. B. Fluoreszenzlöschung, Resonanzenergietransfer auf ein Akzeptormolekül, Lösungsmittelrelaxation oder Fluorophorstabilisierung, zur Folge haben. Diese Effekte haben jeweils Auswirkungen auf die Desaktivierung des angeregten Fluorophors. Sie können entweder zur Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute Q_f führen, die als

$$Q_f = \frac{k_f}{k_f + k_{nf}} \quad (2.10)$$

mit k_f und k_{nf} als Relaxationsgeschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz bzw. der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse definiert ist, oder zur Veränderung der STOKES-Verschiebung des Emissionsspektrums beitragen. Die Untersuchung dieser Effekte kann dann Hinweise auf die Struktur und Dynamik des Fluorophors und der gekoppelten oder freien Biomoleküle in seiner Umgebung liefern.

Thioflavin T (ThT) ist ein Fluorophor, der spezifisch an amyloide Fibrillen bindet. Die Selektivität beruht auf der für amyloide Fibrillen charakteristischen Kreuz- β -Faltblattstruktur (vgl. Kapitel 1.2). Bei dieser Struktur befinden sich die Seitenketten der Aminosäuren alternierend unter- und oberhalb des Peptidstrangs der β -Faltblätter, sodass sie bei Zusammenlagerung mehrerer β -Stränge in Reihe angeordnet sind (*cross-strand ladder*) und parallel zur Fibrillenachse verlaufende Kanäle ausbilden, in die das ThT-Molekül interkalieren kann (Abb. 2.6) [123,124].

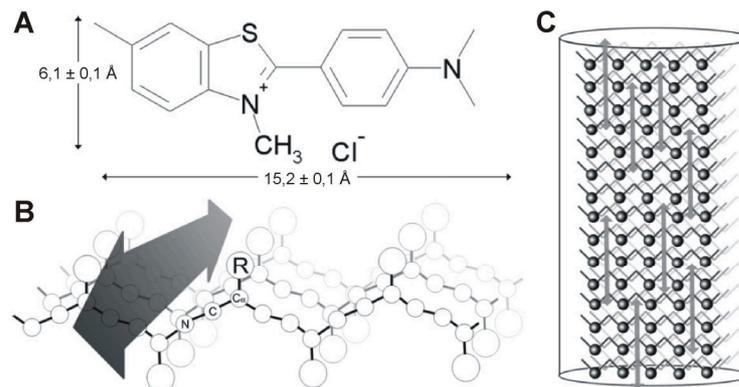


Abbildung 2.6: Struktur und Bindung des ThT an amyloide Fibrillen. **A** Molekulare Struktur und Abmessungen des ThT. **B** Schematische Darstellung einzelner β -Faltblattstränge einer amyloiden Fibrille mit interkalierendem ThT, dargestellt als Pfeil. **C** Darstellung des Protofilaments einer amyloiden Fibrille mit parallel zur Fibrillenachse eingelagerten ThT-Molekülen (graue Pfeile). Modifizierter Nachdruck aus Ref. [123]*.

Diese Bindung und Einlagerung des ThT in die Kanäle der amyloiden Fibrillen führt zur Veränderung des Fluoreszenzverhaltens des gebundenen Fluorophors im Vergleich zum freien Molekül in Lösung. Zum einen erfahren die Absorptions- und Emissionsmaxima eine bathochrome Verschiebung von 385 nm zu 450 nm bzw. von 445 nm zu 482 nm, zum anderen erfolgt eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute des ThT bei 482 nm. Beide Effekte sind auf die durch sterische Hinderung eingeschränkte Rotation der planaren Ringsegmente des ThT um die C-C-Bindung zurückzuführen, wenn das Molekül in den Kanälen gebunden ist. In Lösung verhält sich ThT aufgrund der geringen Energiebarriere wie ein molekularer Rotor (Abb. 2.7). Durch diese Rotation um seine C-C-Bindung erfolgt eine Fluoreszenzlöschung des angeregten Zustands, woraus die geringe Fluoreszenzquantenausbeute des freien Moleküls resultiert. Eingelagert in einer amyloiden Fibrille liegt das ThT-Molekül planar vor, sodass das delokalisierte π -System vergrößert und die Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand verringert wird. Hieraus resultiert die Verschiebung des Spektrums zu größeren Wellenlängen [124,125].

*Reprinted from Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C., & Donald, A. M. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J Struct Biol* **149**, 30–37, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

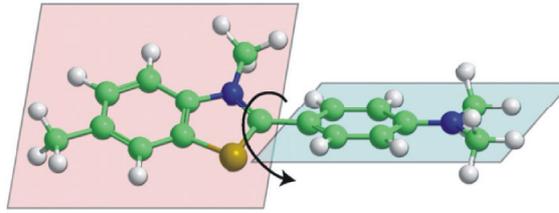


Abbildung 2.7: ThT als molekularer Rotor. Die beiden planaren Ringsegmente rechts und links der C-C-Bindung rotieren entgegengesetzt zueinander um die Bindung. Nachdruck aus Ref. [124]*.

Aufgrund der hohen Selektivität seiner Bindung an amyloide Fibrillen wird ThT häufig zur Verfolgung der Kinetik der Amyloidbildung über die Messung der Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 482 nm verwendet. Typischerweise wird dabei in Übereinstimmung mit dem Modell der nukleationsinduzierten Polymerisation (vgl. Kapitel 1.2) eine sigmoidal verlaufende Aggregationskurve beobachtet, die in lag-, Elongations- und stationäre Phase unterteilt werden kann.

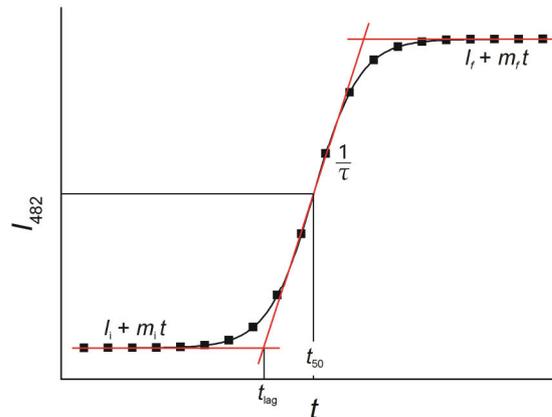


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des sigmoidalen Anstiegs der Fluoreszenzintensität des ThT während der Bildung amyloider Fibrillen. Simulation einer sigmoidalen Aggregationskurve und Anpassung der in Gleichung 2.11 beschriebenen Funktion.

Zur Quantifizierung der Dauer der lag-Phase und der apparenten Wachstumskonstante, k_{app} , bei unterschiedlichen Aggregationsbedingungen kann die in Referenz [126] beschriebene Funktion der Form

$$I_{482} = I_i + m_i t + \frac{I_f + m_f t}{1 + e^{-\frac{t-t_{50}}{\tau}}} \quad (2.11)$$

an diese Aggregationskurven angepasst werden. Dabei gibt I_{482} die gemessene Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 482 nm, t die Zeit und t_{50} den Zeitpunkt an dem 50% der maximalen Fluoreszenzintensität erreicht sind, an. Weiterhin stellen I_i und I_f die initiale bzw. finale Fluoreszenzintensität, m_i bzw. m_f die Steigungen

*Reprinted from Biancalana, M., & Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1405–1412, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

der initialen und finalen Geraden und τ die reziproke apparente Wachstumsgeschwindigkeit dar. Die Dauer der lag-Phase, t_{lag} , sowie die apparente Wachstumskonstante, k_{app} , werden somit beschrieben durch:

$$t_{\text{lag}} = t_{50} - 2\tau, \quad (2.12)$$

$$k_{\text{app}} = \frac{1}{\tau}. \quad (2.13)$$

Experimentelle Durchführung

Zur Bestimmung der Aggregationskinetiken des hIAPP unter verschiedenen Aggregationsbedingungen mittels des fluoreszenzspektroskopischen ThT-Assays wurde das Peptid zunächst wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben vorbereitet. Nach Zugabe des entsprechenden Puffers, der jeweils 10 μM ThT enthielt, sowie eventuell weiterer Komponenten, wie Interaktionsproteinen oder Inhibitoren, wurden unmittelbar je 100 μL dieser Probenlösungen in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (*96 Well, Half Area, Black with Clear Flat Bottom, Polystyrene NBS™ Microplate*, Corning Inc.) gegeben. Die zeitabhängige Fluoreszenzemission des ThT bei 482 nm wurde nach Fluoreszenzanregung bei 440 nm mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Spektrophotometers (Infinite M200, Tecan) für 15 bis 24 h bei einer konstanten Temperatur von 25 °C verfolgt. Im Vorfeld jeder Einzelmessung, die im Abstand von 10 min erfolgten, wurde die Mikrotiterplatte zur Homogenisierung der Proben jeweils für 10 s geschüttelt, bevor nach einer Wartezeit von 15 s die Fluoreszenzmessung erfolgte. Als Kontrolle wurden jeweils auch die zeitabhängigen Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden reinen Pufferlösung, sowie die des Puffers mit eventuellen anderen Komponenten aufgenommen. Die ermittelten Daten wurden durch Subtraktion der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität der entsprechenden Pufferlösungen und *Offset*korrektur korrigiert. Weiterhin wurde zur Bestimmung der relativen Änderungen die Fluoreszenzintensität zu jedem Zeitpunkt durch die Plateauintensität, die als mittlere Fluoreszenzintensität der letzten Stunden jeder individuellen Messung definiert wurde, dividiert. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel (Microsoft Inc.) und Origin (OriginLab Inc.).

2.6 Optische Mikroskopie

Die optische Mikroskopie oder Lichtmikroskopie, im einfachsten Fall als Hellfeldmikroskopie oder mit ihren diversen Spezialtechniken, wie der Phasenkontrast-

Polarisations-, Konfokal- und Fluoreszenzmikroskopie, bietet weit gefächerte Möglichkeiten zur Beobachtung der Morphologie und Interaktion von Biomolekülen bis zu einer Auflösung im Mikrometerbereich. Die Auflösung, d. h. der kritische Abstand d , den zwei Objektpunkte aufweisen müssen, um unterschieden werden zu können, ist dabei durch die Wellenlänge λ und die Beugung des verwendeten Lichts begrenzt. Der Zusammenhang wurde um 1900 von ABBÉ als

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right)} = \frac{0,61 \lambda}{\text{NA}} \quad (2.14)$$

mit n als dem Brechungsindex des verwendeten Immersionsmediums und dem Öffnungswinkel α des Objektivs beschrieben. Der Nenner der Gleichung 2.14 wird in der Praxis zur **numerischen Apertur** (NA) des Objektivs, die einen maximalen Wert von 1,7 erreichen kann, zusammengefasst. Im Allgemeinen gilt somit für die minimale Entfernung zweier Objekte, die gerade noch aufgelöst werden können, $d \approx \lambda/2$ [127]. Diese limitierte Auflösung kann auch durch die genannten Spezialtechniken der Lichtmikroskopie nicht verbessert werden. Diese Techniken tragen aber z. B. dazu bei, kontrastarme Proben mikroskopierbar zu machen (Phasenkontrastmikroskopie), definierte Objekte durch gezielte Markierung in einer größeren Probe sichtbar zu machen (Fluoreszenzmikroskopie) oder optische Schnitte mit hohem Kontrast, die zu einer dreidimensionalen Darstellung rekonstruiert werden können, zu ermöglichen (konfokale Laserrastermikroskopie). Neueste Techniken in der Lichtmikroskopie, wie beispielsweise die STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion*) [128], erlauben allerdings auch eine Auflösung unterhalb des ABBÉ-Limits.

2.6.1 Phasenkontrastmikroskopie

Zur Beobachtung adhärent wachsender eukaryotischer Zellen wird häufig die Phasenkontrastmikroskopie herangezogen, da diese Zellen aufgrund ihrer optischen Transparenz in der Hellfeldmikroskopie nur unzureichend sichtbar sind und erst durch Färbung oder Fixierung sichtbar gemacht werden können. Mittels Phasenkontrastmikroskopie kann darauf verzichtet werden, sodass auch Prozesse an lebenden Zellen untersucht werden können. Die Begründung liegt darin, dass in der Hellfeldmikroskopie amplitudenmodulierende Objekte (sog. Amplitudenobjekte), wie beispielsweise gefärbte Zellen, die die Amplitude des durchfallenden Lichtes schwächen, abgebildet werden. Die Schwächung der Amplitude des Lichts kommt dabei durch destruktive Interferenz des an der Probe gebeugten und um $\lambda/2$ bzw. π phasenverschobenen Lichtanteils und des direkten ungebeugten Lichtanteils zustande (Abb. 2.9). Der Kontrast zum Umgebungsmedium ergibt sich dann aus der Amplitudendifferenz [129].

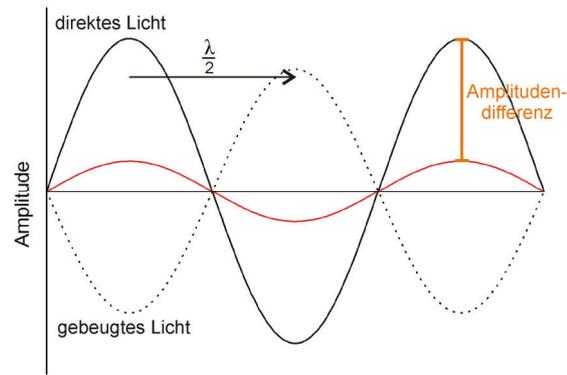


Abbildung 2.9: Amplitudenveränderung des Lichts beim Durchtritt durch ein Amplitudenobjekt in der Hellfeldmikroskopie. Die Amplitude des direkten, ungebeugten Anteils des Lichts ist mit einer durchgezogenen Linie, der an der Probe gebeugte Anteil durch eine unterbrochene Linie dargestellt. Die rote Kurve gibt die durch Interferenz beider Lichtanteile entstehende Amplitudendifferenz wieder.

Lebende ungefärbte, optisch transparente Zellen verändern hingegen durch ihren gegenüber der Umgebung abweichenden Brechungsindex nur die Phase des Lichts (sog. Phasenobjekte), weshalb sie in der Hellfeldmikroskopie kaum sichtbar sind. Das Prinzip der Phasenkontrastmikroskopie beruht nun auf der Umwandlung dieser Phasenmodulation in Amplitudenunterschiede, die als Änderungen des Bildkontrastes sichtbar werden [130]. Der dazu verwendete optische Aufbau eines Phasenkontrastmikroskops ist in Abbildung 2.10 dargestellt.

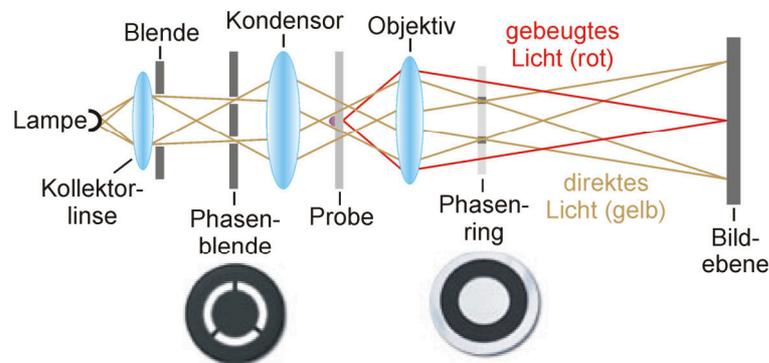


Abbildung 2.10: Optischer Aufbau eines Phasenkontrastmikroskopes.

Die zu untersuchende Probe wird durch eine ringförmige Phasenblende im Kondensator des Mikroskops beleuchtet. Der Teil des Lichts, der an den Phasenobjekten der Probe (z. B. Zellen) durch Beugung abgelenkt wird, hat gegenüber dem direkten ungebeugten Licht eine geringere Amplitude und ist nur um etwa $-(\lambda/4)$ bzw. $-(\pi/2)$ phasenverschoben (Abb. 2.11A), anstatt um $\lambda/2$ wie dies bei Amplitudenobjekten der Fall ist (Abb. 2.9). In der hinteren Brennebene des Objektivs ist ein Phasenring eingebracht, der die Phasenblende des Kondensators exakt überlagert, sodass nur direktes, ungebeugtes Licht auf den Phasenring treffen kann. Er führt dazu, dass das direkte Licht ebenfalls um $\lambda/4$ bzw. $\pi/2$ verschoben und in seiner Amplitude geschwächt wird (Abb. 2.11B). Durch diese Verschiebung und Abschwächung des direkten Lichts kommt es nun auch

in der Bildebene des Phasenobjektes zu destruktiver Interferenz der Lichtanteile, welches als kontrastreiche Darstellung des Objektes aufgrund der Amplitudendifferenz zum Umgebungsmedium sichtbar wird [129].

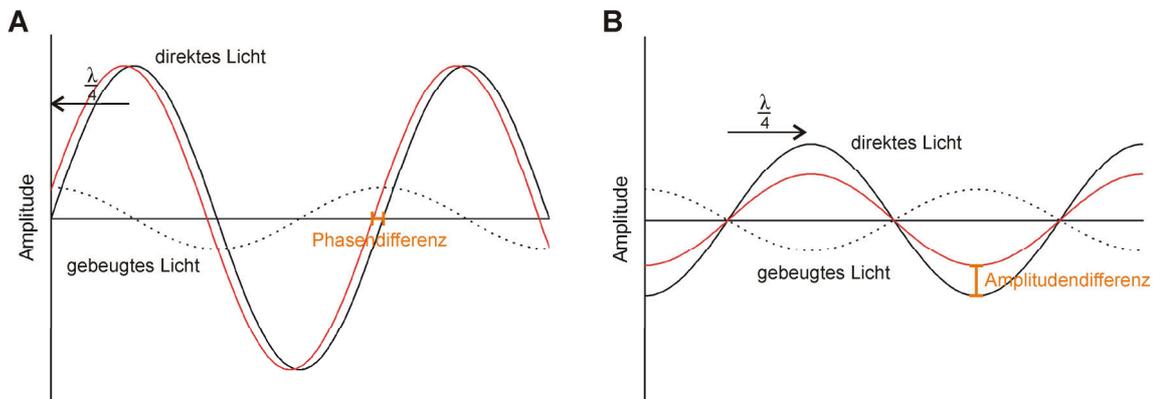


Abbildung 2.11: Amplitudenveränderung des Lichts beim Durchtritt durch ein Phasenobjekt in der Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie. **A** Darstellung der Entstehung der Phasendifferenz durch Beugung des Lichts an einem Phasenobjekt in der Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie. **B** Vorgenommene Modifizierung des direkten Lichtes in der Phasenkontrastmikroskopie, um die in **A** gezeigte Phasendifferenz in eine Amplitudendifferenz umzuwandeln. Die Amplitude des direkten, ungebeugten Anteils des Lichts ist jeweils mit einer durchgezogenen Linie, der an der Probe gebeugte Anteil durch eine unterbrochene Linie dargestellt. Die rote Kurve gibt jeweils die durch Interferenz beider Lichtanteile entstehende Phasen- bzw. Amplitudendifferenz wieder.

Experimentelle Durchführung

Die Technik der Phasenkontrastmikroskopie wurde zur routinemäßigen Kontrolle des Zellwachstums, zur optischen Bestimmung der Konfluenz und zur Bestimmung der Zellzahl mittels NEUBAUER-Zählkammer der Zelllinie INS-1E verwendet (vgl. Kapitel 2.1). Die Zellen konnten dazu direkt in ihrer entsprechenden Zellkulturflasche oder in der NEUBAUER-Zählkammer im Kulturmedium beobachtet werden. Es wurde ein inverses Mikroskop des Modells Eclipse TE2000-U (Nikon Inc.) verwendet, welches mit je einem Phasenkontrastobjektiv des Typs CFI Plan Fluor ELWD 20× (*Extra Long Working Distance*, NA 0,45, Phasenblende Ph1, Phasenring DM (*Dark Medium*), *Cover glass thickness* 0-2 mm, WD (*Working Distance*) 7,4 mm, Nikon Inc.) und des Typs CFI 10× (NA 0,25, Phasenblende Ph1, Phasenring ADL (*Apodized Dark Low*), *Cover glass thickness* 1,2 mm, WD 6,2 mm, Nikon Inc.) ausgestattet ist. Aufnahmen der Zellen entstanden mit Hilfe der integrierten Kamera Digital Sight DS-5Mc (Nikon Inc.), die über den Kameracontroller Digital Sight DS-U1 (Nikon Inc.) mit einem Computer verbunden ist und mit der Software ACT-2U (Nikon Inc.) gesteuert werden kann.

2.6.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur temperaturabhängigen Untersuchung von isolierten INS-1E-Lipidmembranen in Form von GUV, sowie zur Analyse der Interaktion dieser Lipidmembranen mit hIAPP

wurde eine Kombination aus konfokaler Laserrastermikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) und Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Das Prinzip beruht auf dem seriellen, punktweisen Beleuchten und Anregen („Abrastern“) der Probe mit einem durch eine Anregungslochblende oder durch Einkopplung in eine Glasfaser fokussierten Laserstrahl. Der Laserstrahl passiert dazu nach der Fokussierung zunächst einen Anregungsfilter, bevor er über einen dichroitischen Spiegel auf das Objektiv und die Probe projiziert wird. Die Fluoreszenzemission der Probe wird durch denselben dichroitischen Spiegel von der Anregungsstrahlung separiert und gelangt nach Durchtreten des Emissionsfilters und der Detektorlochblende zum PMT (*photomultiplier tube*) Detektor. Die Rekonstruktion des Gesamtbildes der Probe aus den abgerasterten Einzelpunkten wird am Computer durchgeführt. Das Abrastern der Probe erfolgt in der Regel durch die Bewegung von Spiegeln, die sich zwischen dem dichroitischen Spiegel und dem Objektiv befinden. Der vereinfachte schematische Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 2.12 dargestellt.

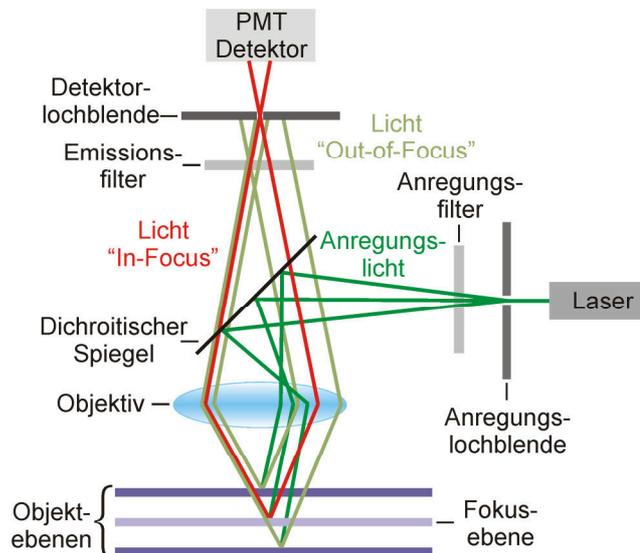


Abbildung 2.12: Vereinfachter schematischer Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops.

Die Kombination der konfokalen Laserrastermikroskopie mit der Fluoreszenzmikroskopie wird häufig für die Untersuchung biologischer Proben verwendet, da diese einige Vorteile gegenüber der konventionellen Weitfeldfluoreszenzmikroskopie aufweist. Die Auflösung der konfokalen Mikroskopie ist dabei mit

$$d_{\text{lateral}}(\text{konfokal}) = \frac{0,4 \lambda}{\text{NA}} \quad (2.15)$$

und

$$d_{\text{axial}}(\text{konfokal}) = \frac{1,4 \lambda n}{\text{NA}^2} \quad (2.16)$$

nur unwesentlich besser als in der konventionellen Mikroskopie [127]. Der große Vorteil dieser Technik liegt durch den Einsatz von Lochblenden in der ausschließlichen Detektion der Fluoreszenzemission, die aus der Fokusebene (*In-Focus*) stammt, sodass auch biologische Proben, deren z-Ausdehnung größer als die wellenoptische Tiefenschärfe des verwendeten Objektivs ist, scharf abgebildet werden können. Bei Aufnahme mehrerer optischer Schnitte entlang der z-Achse können biologische Objekte somit dreidimensional rekonstruiert werden. Dies ist mit der konventionellen Weitfeldfluoreszenzmikroskopie nicht möglich, da dort die Fluoreszenzemission anderer Ebenen (*Out-of-Focus*) die Emission der Fokusebene überlagert, sodass unscharfe Bilder mit geringer Auflösung und geringem Kontrast entstehen.

Die Anregung des Fluorophors erfolgt bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie in der Regel durch Absorption eines Photons (Ein-Photonen-Anregung), dessen Energie der Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand entspricht. Fluoreszenzanregung ist allerdings auch durch die simultane Absorption zweier oder mehrerer Photonen (Zwei-Photonen- oder Multi-Photonen-Anregung) geringerer Energie, d. h. größerer Wellenlänge, möglich. Beispielsweise kann ein Fluorophor, dessen Absorptionsmaximum bei 400 nm liegt, durch Absorption zweier Photonen mit einer Wellenlänge von 800 nm angeregt werden. Die Zwei-Photonen-Anregung ist ein nicht-linearer Prozess; die Absorptionswahrscheinlichkeit folgt der eingestrahelten Lichtintensität in einer quadratischen Abhängigkeit. Zur Zwei-Photonen-Anregung ist somit eine sehr hohe Lichtintensität erforderlich, um die Wahrscheinlichkeit des zeitlich (innerhalb von 10^{-18} s) und räumlich überlappenden Eintreffens zweier Photonen, die dann zur Absorption zu Verfügung stehen, zu erhöhen. Eine entsprechend hohe Lichtintensität kann durch gepulste Laser mit Modenkopplung (*mode-locking*), wie beispielsweise durch einen Titan:Saphir-Laser (TiSa-Laser), erzielt werden. Es können demzufolge nur Fluorophore, die sich in einer Region mit hohem Photonenfluss befinden, angeregt werden. Die Lichtintensität in einer Probe nimmt in Form einer quadratischen Funktion mit Erhöhung des z-Abstands von der Fokusebene ab, im Gegensatz zur konstanten Lichtintensität bei der Ein-Photonen-Anregung. Somit fällt auch die Wahrscheinlichkeit der Absorption der Photonen außerhalb der Fokusebene drastisch ab und es kommt nahezu ausschließlich in der Fokusebene zur Fluoreszenzanregung. Durch diese Art der Fluoreszenzanregung erfolgt eine Detektion der Fluoreszenzemission ausschließlich aus der Fokusebene, ähnlich wie in der konfokalen Mikroskopie, welches ebenfalls die scharfe und schichtweise Abbildung biologischer Proben erlaubt. Vorteile gegenüber der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie mit Ein-Photonen-Anregung liegen darin, dass es nicht zum

Photobleaching außerhalb der Fokusebene kommt und dass das Anregungslicht nicht durch Absorption außerhalb der Fokusebene abgeschwächt wird [131,132].

Experimentelle Durchführung

Die verwendeten GUV wurden, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, hergestellt. Zur Kontrolle wurden jeweils vor Zugabe der Peptide einige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der reinen Vesikel angefertigt. Die zu untersuchenden Peptide wurden im Anschluss an diese Kontrollmessungen direkt in die Fluoreszenzmesszelle injiziert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit Hilfe des konfokalen Laserrastermikroskops MRC 1024 (erweitert für Zwei-Photonen-Anregung, Bio-Rad Laboratories Inc.), welches an ein inverses Mikroskop des Modells Eclipse TE-300DV (Nikon Inc.) gekoppelt ist, aufgenommen. Die jeweils verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 2.7 aufgezeigt.

Tabelle 2.7: Gewählte fluoreszenzmikroskopische Einstellungen

Laser	Laserlinie/ Wellenlänge	Filter- block 1	Fluorophore (Anregungs-/ Emissionsmaximum)	Filter- block 2	Emissions- filter (vor den PMT)	PMT
TiSa	820 nm (2-Photonen- Anregung)	TS1	DAC (~430 nm/470 nm)	A2	455 nm/30 nm FWHM	2
Kr/Ar	488 nm	T1	BODIPY FL (~503 nm/512 nm) Fluorescein (~485 nm/514 nm)	A2	522 nm/35 nm FWHM	2
Kr/Ar	568 nm	T1	Rh (~557 nm/571 nm)	A2	580 nm/32 nm FWHM	1
Kr/Ar	647 nm	T1	ATTO 647 (~645 nm/669 nm)	A2	680 nm/32 nm FWHM	3

TS1: 650 DCSPXR und E625SP (*Dichroic beam splitter* und *short pass filter*; Reflexion im Bereich 690-1075 nm, Transmission im Bereich 450-610 nm)

T1: 488DF10, 568DF10, 647DF10 (*Triple dichroic beam splitter*; Reflexion bei 488, 568, 647 nm (Bandbreite je 10 nm), Transmission bei 522, 605, 680 nm (Bandbreite je 35 nm))

A2: 565LP (*Long pass filter*; Reflexion im Bereich < 565 nm, Transmission im Bereich > 565 nm)

FWHM: *full width at half-maximum*

Dieses konfokale System enthält einen Krypton/Argon-Laser (Kr/Ar-Laser, Dynamic Laser), der mit seinen drei Laserlinien Fluoreszenz bei 488 nm, 568 nm und 647 nm anregen kann. Zusätzlich ist ein TiSa-Laser (Mira 900, gepumpt durch einen 5 W Laser des Modells Verdi, Coherent Inc.) in das konfokale System integriert, der zur Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung verwendet wurde. Die Fluoreszenzemission wird über drei PMT detektiert, denen jeweils eine Detektorlochblende in Form einer verstellbaren Iris und ein Emissionsfilter vorgeschaltet sind. Das inverse Mikroskop wurde mit einem Objektiv des Typs CFI Plan Apo 60× WI (*Water immersion*, NA 1,2, *Cover glass*

thickness 0,15-0,18 mm, WD 0,22 mm, Nikon Inc.) genutzt. Die Steuerung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops und die Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder mit einer Auflösung von 512×512 Pixeln erfolgte mit Hilfe der Software LaserSharp2000 (BioRad Laboratories Inc.). Die Bildbearbeitung, bestehend aus Hintergrundkorrektur, Kontrasterhöhung sowie ggf. Überlagerung der Einzelaufnahmen bei Einsatz mehrerer Fluorophore, wurde mit der Software Fiji [133] vorgenommen.

2.7 Rasterkraftmikroskopie

Zur Untersuchung des Phasenverhaltens der isolierten Lipidsysteme bei Raumtemperatur sowie der Morphologie der Peptidspezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder als Reaktion auf Inkubationsbedingungen wurde die Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) herangezogen.

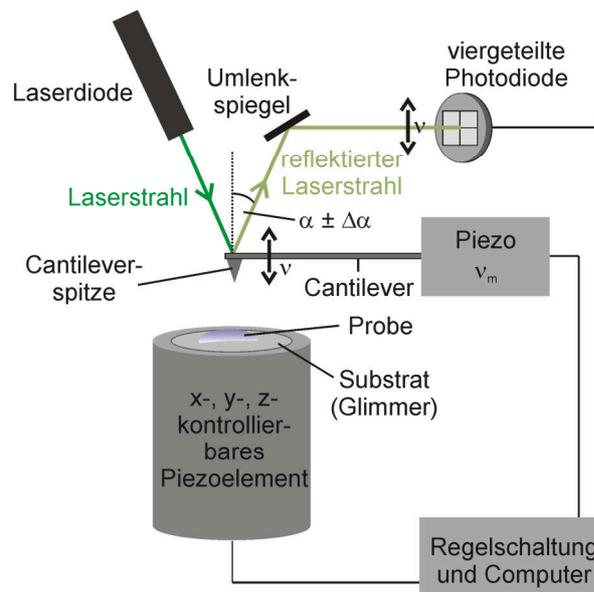


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops zur Messung im Nichtkontakt- oder *tapping*-Modus.

Bei dieser Methode (Abb. 2.13), die eine Auflösung im Nanometerbereich bietet, wird die Oberfläche der Probe von einer sehr feinen Spitze, die am Ende eines flexiblen Cantilevers befestigt ist, abgetastet (bzw. abgerastert). Die präzise laterale und vertikale Position der Probe in Bezug zur Spitze wird dabei von einem computerkontrollierten Piezoelement angesteuert. Wechselwirkungen zwischen der Probenoberfläche und der Spitze führen je nach Messmodus entweder zur direkten Auslenkung des Cantilevers oder zur Änderung der Schwingungsamplitude des durch ein weiteres Piezoelement zur Oszillation angeregten Cantilevers. In beiden Fällen werden die Änderungen mit Hilfe eines Laserstrahls registriert, der auf die Rückseite des Cantilevers gerichtet ist und dessen dortige Reflexion von einer viergeteilten Photodiode detektiert wird. Die

resultierende Veränderung des Reflexionswinkels α des Laserstrahls wird zur Berechnung eines topologischen Abbildes der Probe verwendet [134,135].

Wechselwirkungen, die zwischen Probenoberfläche und Spitze auftreten, sind abstandsabhängig und können näherungsweise mit dem LENNARD-JONES-Potential beschrieben werden. Somit resultieren bei Annäherung der Spitze an die Probenoberfläche bis zum Erreichen des Gleichgewichtsabstands attraktive VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen. Im Gleichgewichtsabstand werden die attraktiven Kräfte gerade durch repulsive Wechselwirkungen kompensiert und bei weiterer Annäherung der Spitze an die Oberfläche treten elektrostatische Abstoßungseffekte aufgrund des PAULI-Verbots auf [87]. Abhängig davon, welche Wechselwirkungskräfte hauptsächlich zur Interaktion von Probenoberfläche und Cantileverspitze beitragen, gibt es drei typische Modi in denen AFM-Messungen durchgeführt werden können: den Kontakt-, den Nichtkontakt- und den *tapping*-Modus. Im Kontakt-Modus besteht ein direkter Kontakt zwischen Probe und Spitze, bei dem die Spitze mit einer Kraft im pN- bis nN-Bereich auf die Oberfläche drückt, sodass die Untersuchung hauptsächlich unter Ausnutzung repulsiver Wechselwirkungen erfolgt. Die starke Abstandsabhängigkeit dieser Kräfte sorgt somit für eine sehr hohe Auflösung. Bei Messungen im Nichtkontakt-Modus wird die Cantileverspitze in einem gewissen Abstand über die Probe geführt und bei oder nahe ihrer Eigenfrequenz ν_0 zur Oszillation angeregt. Hauptsächlich attraktive VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probenoberfläche führen hier zur Erniedrigung der Resonanzfrequenz um $\Delta\nu$ und damit ebenfalls zur Abnahme der Schwingungsamplitude um ΔA bei der Messfrequenz ν_m (Abb. 2.14). Aus diesen Informationen kann die Oberflächentopologie der Probe extrahiert werden. Der *tapping*-Modus, welcher für alle in dieser Arbeit gezeigten AFM-Messungen verwendet wurde, vereinigt die Eigenschaften beider Modi. Auch hier wird die Cantileverspitze zunächst bei oder nahe ihrer Eigenfrequenz ν_0 zur Oszillation angeregt. Die oszillierende Spitze wird nun allerdings an die Probe angenähert, bis es zur leichten periodischen Berührung der Probenoberfläche während der Schwingung am Minimum der Amplitude kommt. Durch diese periodischen Berührungen sowie durch die Wechselwirkung aufgrund anziehender VAN-DER-WAALS-Kräfte kommt es, wie im Nichtkontakt-Modus, zur Verschiebung der Resonanzfrequenz um $\Delta\nu$ zu niedrigeren Frequenzen und folglich zur Dämpfung der Schwingungsamplitude um ΔA bei der Messfrequenz ν_m sowie zur Phasenverschiebung der Schwingung um $\Delta\varphi$ (Abb. 2.14). Passiert die Spitze während der Messung eine Erhöhung der Probenoberfläche, erfolgt eine weitere Abnahme der Schwingungsamplitude bzw. Verschiebung der Phasenlage. Durchläuft die Spitze eine Senke kommt es hingegen zur Erhöhung der Schwingungsamplitude, bis maximal die freie Schwingungsamplitude A_0 bzw. die Phasenlage im Ausgangszustand erreicht wird.

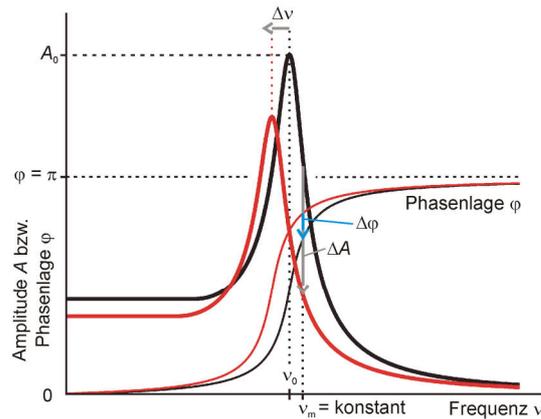


Abbildung 2.14: Darstellung von Schwingungsamplitude und Phasenlage in der Nichtkontakt- und *tapping*-Modus-AFM. Die Amplitude A des Cantilevers bei der Eigenfrequenz ν_0 ist in schwarz dargestellt. Bei Annäherung an die Probe führen Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probenoberfläche zur Erniedrigung der Resonanzfrequenz um $\Delta\nu$ (rot) und damit ebenfalls zur Dämpfung der Schwingungsamplitude um ΔA bei der Messfrequenz ν_m sowie zur Phasenverschiebung der Schwingung um $\Delta\varphi$.

Während der Messungen im *tapping*-Modus wird die Schwingungsamplitude über eine Regelschaltung (*feedback loop*) konstant gehalten (Abb. 2.13). Die Änderungen der Amplitude werden durch das optische System aus Laser und viergeteilter Photodiode detektiert und über einen Controller, der die gemessene Amplitude mit der gesetzten Amplitude vergleicht und bei Abweichungen ein Regeldifferenzsignal sendet, rückgekoppelt. Diese Regeldifferenz führt zur Veränderung des Abstands von Probenoberfläche und Spitze durch das Piezoelement, sodass die Schwingungsamplitude konstant gehalten wird. Außerdem wird diese Regeldifferenz, die ein Maß für die Oberflächenunebenheiten in vertikaler Richtung ist, als Funktion der lateralen Position der Spitze ausgedrückt und somit zur Aufzeichnung der Oberflächentopologie der Probe verwendet. Neben den Informationen zur Topologie können durch die Berührung der Oberfläche in diesem Messmodus zusätzliche Informationen zu anderen Eigenschaften der Oberfläche (z. B. deren Elastizität) gewonnen werden, da verschiedene Materialien zu einer unterschiedlichen Dämpfung der Schwingungsamplitude und damit zu einer unterschiedlichen Phasenverschiebung führen. Die AFM-Methode des *tapping*-Modus schließt die Lücke zwischen Kontakt- und Nichtkontakt-Modus. Mit Anwendung dieses Verfahrens ist es möglich, im Vergleich zum Nichtkontakt-Modus höher aufgelöste Bilder auch von sehr weichen Oberflächen, wie beispielsweise biologischen Proben, zu erhalten. Scherkräfte, die im Kontakt-Modus auftreten und gerade biologische Proben leicht beschädigen, werden hingegen vermieden. Darüber hinaus können AFM-Messungen im *tapping*-Modus auch in einer Flüssigzelle durchgeführt werden, sodass auch kinetische Prozesse oder biologische Proben, die sich nicht für Trockenmessungen eignen, in hoher Auflösung beobachtet werden können [87,135].

Experimentelle Durchführung

Zur Herstellung einer Lipiddoppelschicht der isolierten INS-1E-Lipidmischung auf Muskovit-Glimmer (AFM DiscMica, \varnothing 9.9 mm, NanoAndMore GmbH) zur Untersuchung mittels AFM wurden zunächst LUV (vgl. Kapitel 2.2.2.1) in einer Konzentration von 2 mg/mL hergestellt. Anschließend wurden bis zu 80 μ L dieser LUV-Lösung auf eine frisch gespaltene Glimmerscheibe gegeben und in einer befeuchteten Inkubationskammer bei ~ 70 °C für 2 h zum spontanen Spreiten der Vesikel auf der Glimmeroberfläche inkubiert. Zur Entfernung verbliebener Vesikel wurde die Probe vorsichtig mit dem entsprechenden Puffer gespült, auf der Probenhalterung des AFM platziert und in die Flüssigzelle eingebaut.

Für zeitabhängige AFM-Messungen der Peptidaggregation auf Glimmer wurde zunächst der entsprechende Puffer in die AFM-Flüssigzelle injiziert, um Bilder der Glimmeroberfläche vor der Peptidzugabe aufzunehmen. Im Anschluss wurden ~ 200 μ L der Peptidlösung in die Zelle gespült und Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Nach abgeschlossener Aggregation der Peptide wurde die Probe, die das aggregierte Peptid adsorbiert auf Glimmer enthielt, aus der Flüssigzelle entnommen, mit Milli-Q-H₂O gespült und zunächst mit einem Stickstoffstrom, sowie anschließend über Nacht im Vakuum, getrocknet. Somit konnte diese Probe abschließend noch einmal an Luft in mehreren Bereichen mittels AFM untersucht werden.

Zur AFM-Untersuchung der finalen Morphologie der aggregierten Peptide, nach der Durchführung eines fluoreszenzspektroskopischen ThT-Assays, wurde ein 50 μ L-Aliquot der aggregierten Peptide direkt aus der Mikrotiterplatte, die zur Durchführung des ThT-Assays verwendet wurde, entnommen und auf eine frisch gespaltene Glimmerscheibe gegeben. Dort wurde die Lösung im Verhältnis 1:1 mit Milli-Q-H₂O verdünnt, für wenige Minuten inkubiert und mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde die Probe mit Milli-Q-H₂O gespült und erneut zunächst mit einem Stickstoffstrom und anschließend über Nacht im Vakuum getrocknet.

Alle AFM-Messungen wurden im *tapping*-Modus mit einem MultiModeTM Atomic Force Microscope (Digital Instruments Inc.) aufgenommen, welches mit Hilfe der Software NanoScope Control über einen NanoScope[®] IIIa Scanning Probe Microscope Controller (beides Digital Instruments Inc.) gesteuert wird. Messungen der isolierten Membransysteme sowie zeitabhängige Messungen der Peptidaggregation in Pufferlösung wurden mit einem J-Scanner (maximaler Messbereich 125 \times 125 μ m) und SNL-Cantilevern (*sharp nitride lever*, Veeco Instruments Inc.), die in eine Flüssigzelle des Modells MTFML (Veeco Instruments Inc.) eingebaut wurden, durchgeführt. Die Spitzen besitzen eine nominale Kraftkonstante von 0,32 N/m und wurden mit einer Resonanzfrequenz von ~ 9 kHz und einer Messamplitude von 200-400 mV betrieben.

AFM-Aufnahmen der getrockneten Peptidproben wurden mit einem E-Scanner (maximaler Messbereich $15 \times 15 \mu\text{m}$) unter Verwendung eines MMMC Cantileverhalters (beides Veeco Instruments Inc.) mit einem PPP-NCHR-Cantilever (*PointProbe[®] Plus Non-Contact / Tapping Mode - High Resonance Frequency - Reflex Coating Silicon-SPM-Sensor*, NanosensorsTM) erzielt. Diese Cantilever besitzen eine nominale Kraftkonstante von 42 N/m und wurden mit einer Resonanzfrequenz von $\sim 240 \text{ kHz}$ und einer Messamplitude zwischen 20 und 350 mV verwendet. Zu allen Proben wurden jeweils Höhen- und Amplituden- bzw. Phasenaufnahmen mit Messraten von $0,75$ - $1,5 \text{ Hz}$ und einer Auflösung von 512×512 Pixeln bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Bildbearbeitung und Analyse erfolgte mit der Software NanoScope Version 5.

3

ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER EINZELNEN PROJEKTE

3.1 Wechselwirkung des hIAPP mit komplexen, zellulären Lipidmembranen^{*}

3.1.1 Hintergrund, Motivation und Zielsetzung

Das Kernproblem der hIAPP-Aggregation und -Fibrillenbildung ist, wie bereits in der Einleitung in Kapitel 1.3.3 beschrieben, die Assoziation mit Typ II Diabetes mellitus und die dafür verantwortliche Permeabilisierung der β -Zellmembran der LANGERHANS-schen Inseln des Pankreas. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Membranzerstörung ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Viele Studien der hIAPP-Aggregation an unterschiedlichen neutralen (zwitterionischen) sowie negativ geladenen Modellmembranen, die eine homogene Lipidphase oder Lipidphasenkoexistenz aufwiesen (vgl. Kapitel 1.4.2), wurden in diesem Kontext bereits durchgeführt [45,77,136–138]. Es konnte dabei unter anderem gezeigt werden, dass die Anwesenheit einer neutralen, zwitterionischen Membran nicht zur Veränderung der Kinetik oder des Mechanismus der hIAPP-Aggregation beiträgt [136]. Im Gegensatz dazu kommt es zur signifikanten Beschleunigung der Aggregation des hIAPP unter Reduktion der lag-Phase bzw. der Dauer der Nukleibildung bei Inkubation in Anwesenheit von partiell negativ geladenen Membranen. Die schnelle Adsorption des hIAPP, zunächst mittels seines partiell positiv geladenen N-Terminus und anschließend durch hydrophobe Wechselwirkungen, scheint dabei zu einer lokalen Konzentrationserhöhung des Peptids an der Membran zu führen, sodass die Bildung eines Nukleationskeims beschleunigt

^{*}Die Ergebnisse dieser Studie wurden in den Referenzen [45] und [140] veröffentlicht und werden in diesem Kapitel teilweise wiedergegeben.

[45] Reprinted from Seeliger, J., & Winter, R. (2012) Islet Amyloid Polypeptide: Aggregation and Fibrillogenesis in vitro and Its Inhibitor. In *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease* (Harris, J. R., Ed.), pp 185–209, Springer Science + Business Media, Dordrecht, with kind permission from Springer Science and Business Media.

[140] Reprinted from Seeliger, J., Weise, K., Opitz, N., & Winter, R. (2012) The Effect of A β on IAPP Aggregation in the Presence of an Isolated β -Cell Membrane, *J Mol Biol* **421**, 348–363, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

verläuft [77,136]. Auch die Heterogenität einer Membran, z. B. durch Lipidphasenkoexistenz, trägt signifikant zur Beschleunigung der Fibrillenbildung bei. Dabei scheint die Adsorption an die Phasengrenze für die lokale Konzentrationserhöhung und die folglich beschleunigte hIAPP-Aggregation verantwortlich zu sein [136,138]. In all diesen Fällen wurden einfache Modellmembranen bestehend aus einer bis zu maximal fünf verschiedenen Lipidkomponenten für die Studien herangezogen. Die native Zellmembran, an der die hIAPP-Aggregation *in vivo* abläuft, ist allerdings allein auf Lipidebene deutlich komplexer aufgebaut. Um nun zu studieren, in wie weit die Ergebnisse der Interaktionsstudien an Modellmembranen mit denen an einer komplexen, zellulären Lipidmembran übereinstimmen, wurden die Lipide der Zelllinie INS-1E isoliert, charakterisiert und im Folgenden für Interaktionsstudien mit hIAPP verwendet. Diese β -Zelllinie, die ursprünglich aus den LANGERHANSschen Inseln des Pankreas der Ratte stammt, wurde verwendet, da β -Zellen auch im biologischen Metabolismus die Interaktionspartner des IAPP darstellen, welches von ihnen sekretiert und prozessiert wird, aber im toxischen Stadium höchstwahrscheinlich auch die Zellmembran dieser Zellen zerstört.

3.1.2 Isolation und Charakterisierung der β -Zellmembran

Verschiedene Methoden zur Isolation der Zellmembran aus den pankreatischen β -Zellen der Ratte (Zelllinie INS-1E) wurden bereits im Rahmen der Masterarbeit [139] verglichen und bezüglich ihrer Lipidausbeute und des verbliebenen Proteingehalts charakterisiert. Dabei erwies sich die Chloroform/Methanol-Extraktion (vgl. Kapitel 2.2.1.1) mit einer relativ hohen Lipidausbeute, einem geringen Proteingehalt von weniger als 2% (w/w) sowie ihrer schnellen und unkomplizierten Durchführbarkeit als effektivste Isolationsmethode. Der Vollständigkeit halber sind die Ergebnisse der Masterarbeit zur Lipidausbeute und zum Proteingehalt, welche pro konfluent mit INS-1E-Zellen bewachsener Zellkulturplatte erhalten wurden, in Tabelle 3.1 nochmals aufgeführt.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Quantifizierung des Lipid- und Proteingehaltes (Nachdruck aus Ref. [139])

Membransystem	$n(\text{Lipid}) / \text{nmol}^*$	$m(\text{Lipid}) / \mu\text{g}^\dagger$	$m(\text{Protein}) / \mu\text{g}^*$	Proteingehalt / %
INS-1E-Zellmembran	321 ± 73	241 ± 55	$3,9 \pm 0,9$	$\sim 1,6$

*Lipid/Proteinmenge pro konfluent bewachsener 75 cm² Zellkulturplatte

†Umrechnung unter der Annahme $M(\text{Lipid}) = 750 \text{ g/mol}$

Die Bestimmung der Zusammensetzung der isolierten β -Zellmembranlipide erfolgte durch massenspektrometrische Analyse am Kansas Lipidomics Research Center (Kansas State University, USA). Im Rahmen dieser Untersuchung konnten 280 verschiedene Lipidspezies identifiziert werden. Wie in Abbildung 3.1A zu erkennen,

wurden die beiden zwitterionischen Phospholipidkopfgruppen **Phosphatidylcholin** (PC, inkl. SM und DSM) und **Phosphatidylethanolamin** (PE) mit jeweils insgesamt $\sim 73,5$ mol% bzw. $\sim 24,0$ mol% als Hauptkopfgruppenbestandteile der β -Zellmembran ermittelt. Die anionischen Kopfgruppen **Phosphatidylinositol** (PI), **Phosphatidylserin** (PS), **Phosphorsäure** (PA, *phosphatidic acid*) und **Phosphatidylglycerol** (PG) machen zusammen nur einen geringen Anteil von $\sim 2,5$ mol% aus. Auch besteht diese β -Zellmembran hauptsächlich aus Glycerophospholipiden (95,4 mol%), wobei $\sim 0,6$ mol% dieser als Lysolipide vorliegen und nur eine Fettsäurekette tragen (LPC, LPE) und $\sim 7,2$ mol% mit ihren Fettsäureketten über eine Etherbindung (ePC, ePE, ePS) anstelle einer Esterbindung verknüpft sind. Phosphosphingolipide (SM, DSM, Cer-PE) sind hingegen nur zu $\sim 4,6$ mol% im isolierten Zellmembransystem zu finden.

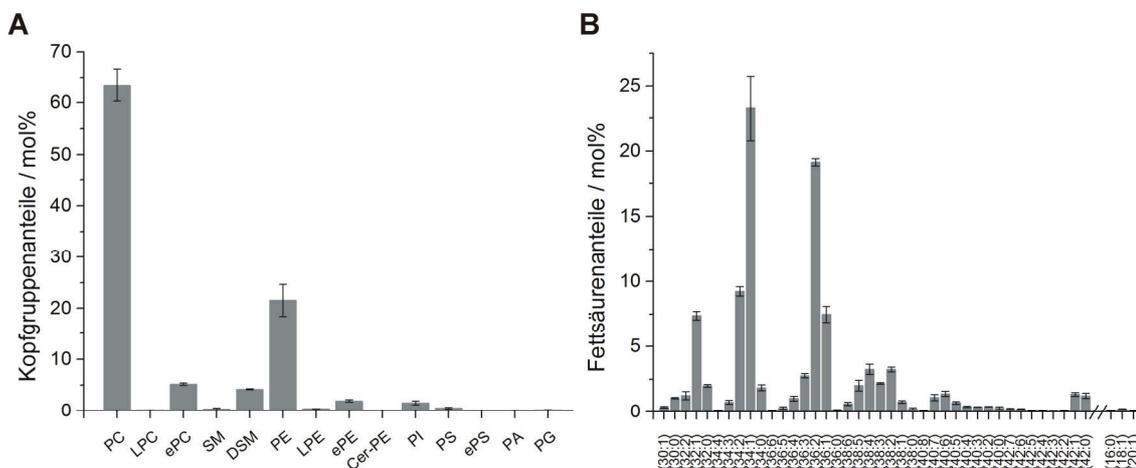


Abbildung 3.1: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der isolierten β -Zellmembran. **A** Anteile der entsprechenden Phospholipidkopfgruppen an der Zellmembran. PC: Phosphatidylcholin, LPC: LysoPC, ePC: etherverknüpftes PC, SM: Sphingomyelin, DSM: DihydroSM, PE: Phosphatidylethanolamin, LPE: LysoPE, ePE: etherverknüpftes PE, Cer-PE: Ceramid-PE, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, ePS: etherverknüpftes PS, PA: Phosphorsäure, *phosphatidic acid*, PG: Phosphatidylglycerol. **B** Anteile der Fettsäuren der Phospholipide an der β -Zellmembran (Anzahl der Kohlenstoffatome : Anzahl der Doppelbindungen). Im linken Abschnitt sind die Gesamtkettenlängen und Doppelbindungen der Phospholipide mit doppelten Fettsäureketten dargestellt, rechts die Kettenlängen und Doppelbindungen der Lysophospholipide mit nur einer Fettsäurekette. Modifizierter Nachdruck aus Ref. [140].

In Bezug auf die Fettsäureketten der Phospholipide des isolierten β -Zellmembransystems kann mittels massenspektrometrischer Analyse nur eine Aussage zur Gesamtkettenlänge sowie zur Gesamtzahl der vorhandenen Doppelbindungen getroffen werden, nicht aber zur Kettenlänge der einzelnen Fettsäureketten und zur Verteilung und Position der Doppelbindungen. Die Analyse (Abb. 3.1B) zeigt mit $\sim 23,3$ mol% den höchsten Anteil an Fettsäuren mit einer Gesamtkettenlänge von 34 Kohlenstoffatomen sowie einer Doppelbindung (34:1), gefolgt von der Kombination (36:2) mit einem Anteil von $\sim 19,2$ mol%. Da aus der Literatur bekannt ist, dass vor allem in Säugetieren hauptsächlich Fettsäuren mit geradzahlgiger Kettenlänge gebildet werden [141–143] und

in Lipiddoppelschichten, wie Zellmembranen, von ähnlichen Kettenlängen beider Fettsäureketten ausgegangen werden kann, könnte es sich bei diesen beiden Phospholipiden um Palmitoyloctadecanoylphospholipide (Fettsäureketten (16:0) und (18:1)) bzw. Dioctadecanoylphospholipide (zwei Fettsäureketten (18:1)) handeln. Diese Hypothese wird weiterhin von der Tatsache unterstützt, dass im Fall der Lysolipide mit nur einer Fettsäure ebenfalls hauptsächlich die Kombinationen (16:0) und (18:1) sowie außerdem (20:1) auftreten. In der weiteren Betrachtung stechen die Kombinationen (32:1), (34:2) und (36:1) bei den Phospholipiden mit doppelter Fettsäurekette hervor, auch diese könnten Einzelkettenlängen von (16:0)/(16:1), (16:1)/(18:1) bzw. (18:0)/(18:1) zugeordnet werden. Diese mittels Massenspektrometrie erzielten Ergebnisse stimmen insgesamt gut mit den Phospholipidanteilen, die in isolierten pankreatischen Inseln von verschiedenen Nagern identifiziert wurden, überein [144–146]. Auch dort wurden als häufigste Fettsäureketten die Kombination (16:0), (18:0), (20:4), (18:1) und (18:2) gefunden, sowie PC und PE als hauptsächliche Kopfgruppenkomponenten detektiert. Der einzige Unterschied besteht darin, dass der beschriebene Anteil an anionischen Kopfgruppen (PI, PS, PA und PG) mit Werten im Bereich von 8,9 bis 25 mol% in pankreatischen Inseln von Ratten und Mäusen [144–146] im Vergleich zum Anteil an der isolierten β -Zellmembran der Ratte von 2,5 mol% höher liegt. Dies könnte allerdings auf die in diesen Studien vollständig isolierten und zur Analyse verwendeten pankreatischen Inseln zurückzuführen sein, die neben β -Zellen auch α -, δ - und PP-Zellen enthalten, welches die Ursache für Unterschiede im Anteil an anionischen Lipidkopfgruppen sein könnte.

Zur weiteren Charakterisierung des isolierten β -Zellmembransystems, in Bezug auf mögliche Phasenumwandlungen und Konformationsänderungen der Lipidalkylketten, wurden temperaturabhängige FTIR-spektroskopische Messungen durchgeführt. Dazu wurden LUV bestehend aus den β -Zelllipiden (15 mg/mL) in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4 in D_2O) verwendet. Die deutlichsten IR-Absorptionsbanden der Lipidalkylketten sind die symmetrischen ($2849\text{--}2855\text{ cm}^{-1}$) und antisymmetrischen ($2916\text{--}2925\text{ cm}^{-1}$) Streckschwingungen der CH_2 -Gruppen, die sehr empfindlich auf Änderungen des *trans/gauche*-Verhältnisses innerhalb der Alkylketten reagieren und aus diesem Grund zur Detektion von Phasenumwandlungen herangezogen werden können. Die temperaturabhängige Änderung des Maximums der Wellenzahl dieser symmetrischen CH_2 -Streckschwingung, $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, der isolierten Zellmembranlipide ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Das Bandenmaximum der $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$ verschiebt sich im Temperaturbereich von 5 bis 14 °C linear von $2852,4\text{ cm}^{-1}$ bis $2852,9\text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen. Diese Wellenzahlenwerte weisen auf eine Lipidphase mit hoher konformationeller Ordnung hin, die als flüssig-geordnete Phase beschrieben werden kann. Bei Temperaturen bis 22 °C kommt es zu einer sigmoidalen Veränderung der Steigung, welche auf die Bildung einer neuen Lipidphase mit koexistierenden Regionen von flüssig-geordneter

und flüssig-ungeordneter Phase zurückzuführen sein könnte. Im darauf folgenden Temperaturbereich von 22-50 °C erfolgt eine Abnahme der Steigung. Dies deutet auf die Ausbildung einer im Wesentlichen einphasigen, flüssig-ungeordneten Lipidphase hin. Der folgende leichte Anstieg der Steigung von $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$ ab einer Temperatur von 50 °C zeigt die weitere Zunahme an *gauche*-Konformeren in den Alkylketten der Zellmembranlipide, die sich bereits in der flüssig-ungeordneten Lipidphase befinden, an.

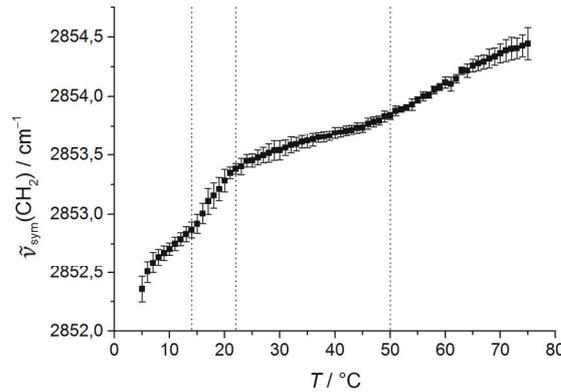


Abbildung 3.2: Charakterisierung möglicher Phasenumwandlungen des isolierten β -Zellmembransystems. Temperaturabhängigkeit des Maximums der symmetrischen CH_2 -Streckschwingungswellenzahl, $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, der aus INS-1E-Zellen isolierten Zellmembranlipide. Die gepunkteten Linien weisen auf nachfolgende Änderungen in der Steigung hin, die auf den Beginn eines Phasenübergangs zurückzuführen sind. Nachdruck aus Ref. [140].

Auch AFM-Aufnahmen der isolierten β -Zellmembran in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 7 mM MgCl_2 , pH 7,4) zeigen bei Raumtemperatur eine homogene Lipidschicht einer Höhe von ~ 4 nm und unterstützen somit die Hypothese einer einphasigen, flüssig-ungeordneten Lipidphase (Abb.3.3A) (Experimentelle Durchführung der AFM-Messungen in Zusammenarbeit mit Dr. Katrin Weise, Postdoktorandin am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I).

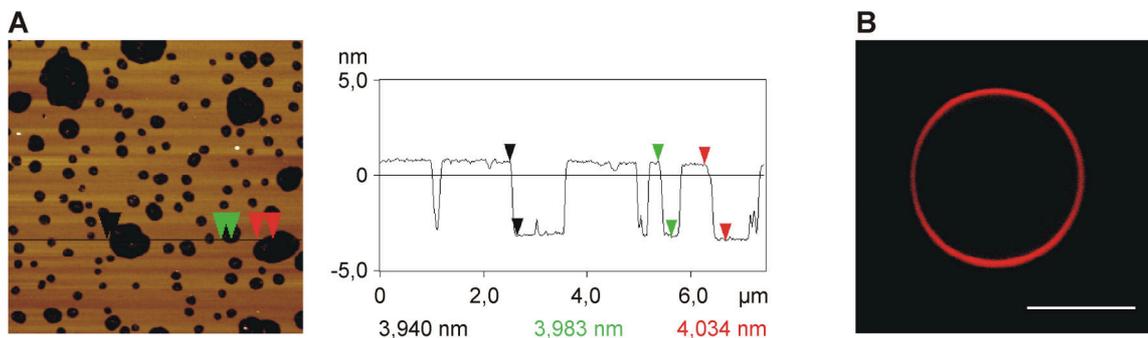


Abbildung 3.3: Rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der isolierten β -Zellmembran. **A** AFM-Aufnahme der β -Zellmembran (hellbraun) auf Glimmer (dunkelbraun) bei Raumtemperatur. Die schwarze Linie im Bild zeigt die Lokalisation des Höhenprofils rechts, bei dem die vertikale Distanz zwischen Pfeilpaaren analysiert wird. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%) markierten GUV der isolierten β -Zellmembran bei $T \approx 25$ °C. Der Maßstab repräsentiert 10 μm . Nachdruck aus Ref. [140].

Weiterhin konnten aus den isolierten β -Zellmembranlipiden mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%) markierte GUV in Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,4) hergestellt werden, die fluoreszenzmikroskopisch betrachtet ebenfalls eine homogene Lipidphase bei 25 °C darstellten (Abb.3.3B).

3.1.3 Aggregationsverhalten des hIAPP an der isolierten β -Zellmembran

Um den Einfluss der isolierten β -Zellmembranlipide auf das Aggregationsverhalten des hIAPP zu untersuchen und mit dem anderer Membransysteme zu vergleichen, wurden fluoreszenzspektroskopische ThT-Messungen durchgeführt. Thioflavin T ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenzintensität sich bei nicht-kovalenter Bindung an amyloide Fibrillen erhöht und somit die hIAPP-Aggregation in Übereinstimmung mit dem Modell der nukleationsinduzierten Polymerisation als sigmoidalen Kurvenverlauf, bestehend aus lag-, Elongations- und stationärer Phase, darstellt (vgl. Kapitel 2.5). Zum Vergleich der Effekte verschiedener Lipidsysteme auf die hIAPP-Aggregation wurden, neben der isolierten β -Zellmembran, zwei weitere teilweise negativ geladene Membransysteme herangezogen. Die verwendete einphasige anionische Membran besteht zu 70 mol% aus dem zwitterionischen Lipid DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) und zu 30 mol% aus dem negativ geladenen DOPG (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)). Die heterogene anionische *raft*-Membran (DOPC /DOPG/DPPC (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) /DPPG (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol))/Chol, molares Verhältnis 15:10:40:10:25) zeigt Koexistenz von flüssig-geordneter und flüssig-ungeordneter Lipidphase bei Raumtemperatur und weist in beiden Lipidomänen anionische Lipidkopfgruppen auf. Aus allen drei Lipidmischungen wurden LUV hergestellt, die zusammen mit hIAPP ($c = 3 \mu\text{M}$) in ThT-Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 10 μM ThT, pH 7,4) unter gleichzeitiger Messung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität des ThT bei 482 nm inkubiert wurden.

Tabelle 3.2 und Abbildung 3.4 zeigen, dass die isolierten β -Zelllipide die lag-Phase der hIAPP-Aggregation um einen Faktor von 12 reduzieren und die apparente Wachstumskonstante, k_{app} , um das 4-fache ansteigen lassen. Ein ähnliches, etwas stärker beschleunigendes Verhalten konnte in Anwesenheit der anionischen *raft*-Membran detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die einphasige anionische Lipidmembran eine etwas geringere Beschleunigung der hIAPP-Aggregation, aber immer noch eine um ein Drittel verkürzte lag-Phase und eine Verdreifachung der apparenten Wachstumskonstante im Vergleich zur Aggregation des reinen hIAPP. Somit scheint der Einfluss der isolierten β -Zellmembranlipide auf die hIAPP-Aggregation am ehesten dem einer heterogenen anionischen Modellmembran zu entsprechen. Da bei Raumtemperatur allerdings weder in fluoreszenz- noch in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen

Heterogenität der β -Zellmembran in Form von Lipiddomänen detektiert werden konnte, müssen neben den teilweise negativ geladenen Kopfgruppen der β -Zelllipide Heterogenitäten auf Lipidmolekülebene sowie Defektzustände der gebildeten Membran für die beschleunigte hIAPP-Aggregation verantwortlich sein.

Tabelle 3.2: Dauer der lag-Phasen, t_{lag} , und apparente Wachstumskonstanten, k_{app} , der Aggregation des hIAPP in Anwesenheit von Vesikeln verschiedener Zusammensetzung (Nachdruck aus Ref. [140])

Vesikelart	$t_{\text{lag}} / \text{h}$	$k_{\text{app}} / \text{h}^{-1}$
hIAPP	$4,21 \pm 0,24$	$0,85 \pm 0,14$
+ anionische Membran	$1,39 \pm 0,10$	$2,56 \pm 0,04$
+ anionische <i>raft</i> -Membran	$0,25 \pm 0,19$	$5,72 \pm 0,05$
+ β -Zellmembran	$0,35 \pm 0,30$	$3,27 \pm 0,08$

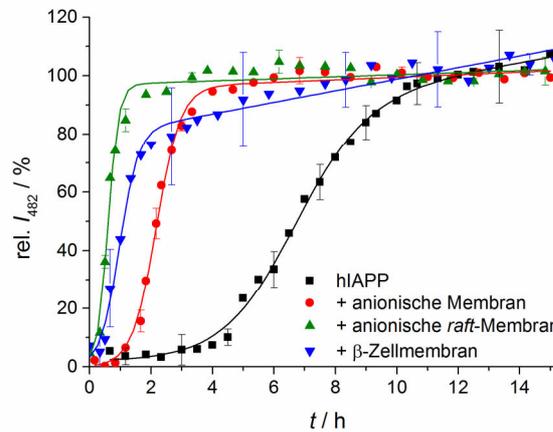


Abbildung 3.4: Aggregationskinetiken des hIAPP in Anwesenheit verschiedener Membransysteme. Relative Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation des hIAPP ($c = 3 \mu\text{M}$) allein (schwarz) und in Anwesenheit von Vesikeln bestehend aus einer anionischen Membran (DOPC/DOPG molares Verhältnis 7:3; rot), einer anionischen *raft*-Membran (DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol, molares Verhältnis 15:10:40:10:25; grün) und den isolierten Lipiden der INS-1E-Zelllinie (blau). Nachdruck aus Ref. [140].

Für ATR-FTIR-spektroskopische Untersuchungen der Änderung der Sekundärstruktur des hIAPP während der Aggregation an der isolierten β -Zellmembran wurden die β -Zelllipide auf dem internen Reflexionselement der ATR-Zelle, einem Germanium-Kristall, gespreitet. Nach Zugabe einer $3 \mu\text{M}$ hIAPP-Lösung in Puffer ($10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $\text{pD } 7,4$ in D_2O) wurde die Adsorption (Abb. 3.5) des hIAPP an die Membran sowie die Sekundärstrukturänderung (Abb. 3.6) zeitabhängig verfolgt. Zur Charakterisierung der Adsorption bezüglich der Kinetik sowie der Menge an adsorbiertem hIAPP wird die Veränderung der Fläche der Amid-I'-Bande herangezogen. Obwohl die Kinetik der hIAPP-Aggregation, wie mittels zeitabhängiger Messung der Fluoreszenzintensität des ThT ermittelt, in Anwesenheit einer anionischen *raft*-Membran etwas stärker beschleunigt wird als bei der Zugabe der β -Zellmembranlipide, erfolgt eine deutlich stärkere Adsorption an die β -Zellmembran im Vergleich zur anionischen *raft*-Membran bei ATR-FTIR-Messungen. Der Grund für

diese starke Adsorption könnte in der wesentlich komplexeren Zusammensetzung der zellulären Membran gegenüber der Modellmembran, die aus lediglich fünf verschiedenen Komponenten besteht, liegen. Aufgrund der Unterschiede in Art und Kettenlänge der zellulären Lipide (vgl. Abb. 3.1) kommt es zu einer höheren Rauigkeit und Heterogenität einer solchen Membran auf Einzelmolekülebene.

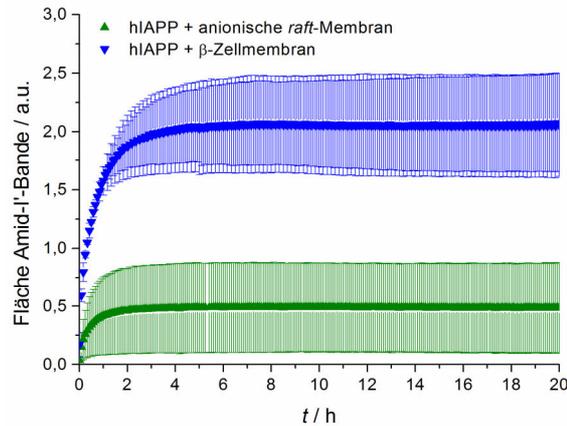


Abbildung 3.5: Vergleich der Adsorptionskinetiken des hIAPP an verschiedenen Membransystemen. Zeitabhängige Veränderung der Fläche der Amid-I'-Bande von 3 μM hIAPP in Anwesenheit einer anionischen *raft*-Membran (DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol, 15:10:40:10:25 (molares Verhältnis); grün) und einer Membran bestehend aus den isolierten β -Zellmembranlipiden (blau). Nachdruck aus Ref. [45].

Die Änderung der Sekundärstruktur des hIAPP während der Aggregation wird bei der ATR-FTIR-Spektroskopie über die Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande ermittelt. Primäre ATR-FTIR-Spektren nach Puffer- und Basislinienkorrektur sind in Abbildung 3.6A dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass es bereits während der Adsorption des hIAPP an die β -Zellmembran, bei noch nicht maximaler Intensität der Amid-I'-Bande, zu einer Verschiebung des Maximums der Bande und somit zu einer Sekundärstrukturumwandlung kommt. Somit kann von einer gleichzeitigen Adsorption und Aggregation des hIAPP an der β -Zellmembran ausgegangen werden. Zur besseren Visualisierung der Strukturumwandlung wurden die Spektren flächennormiert (Abb. 3.6B), sodass die Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von $\sim 1644\text{ cm}^{-1}$ zu 1625 cm^{-1} und der Schnittpunkt aller Spektren in einer Art isosbestischen Punkt bei $\sim 1634\text{ cm}^{-1}$ deutlich wird. Durch FOURIER *self deconvolution* (FSD) und Bildung der zweiten Ableitung der flächennormierten Spektren konnten sechs Subbanden für die Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung ermittelt werden (Abb. 3.6C und D). Unter der vereinfachten Annahme, dass die Übergangsdipolmomente der unterschiedlichen Konformere gleich sind, lässt sich aus der Bandenanpassung der Amid-I'-Bande mit den zugeordneten Subbanden eine Struktur des nach 5 min adsorbierten hIAPP ermitteln, die hauptsächlich aus ungeordneten Strukturen ($\sim 22\%$), β -Schleifen ($\sim 30\%$) und α -Helices ($\sim 17\%$) besteht (Abb. 3.6E und Abb. A.1 im Anhang).

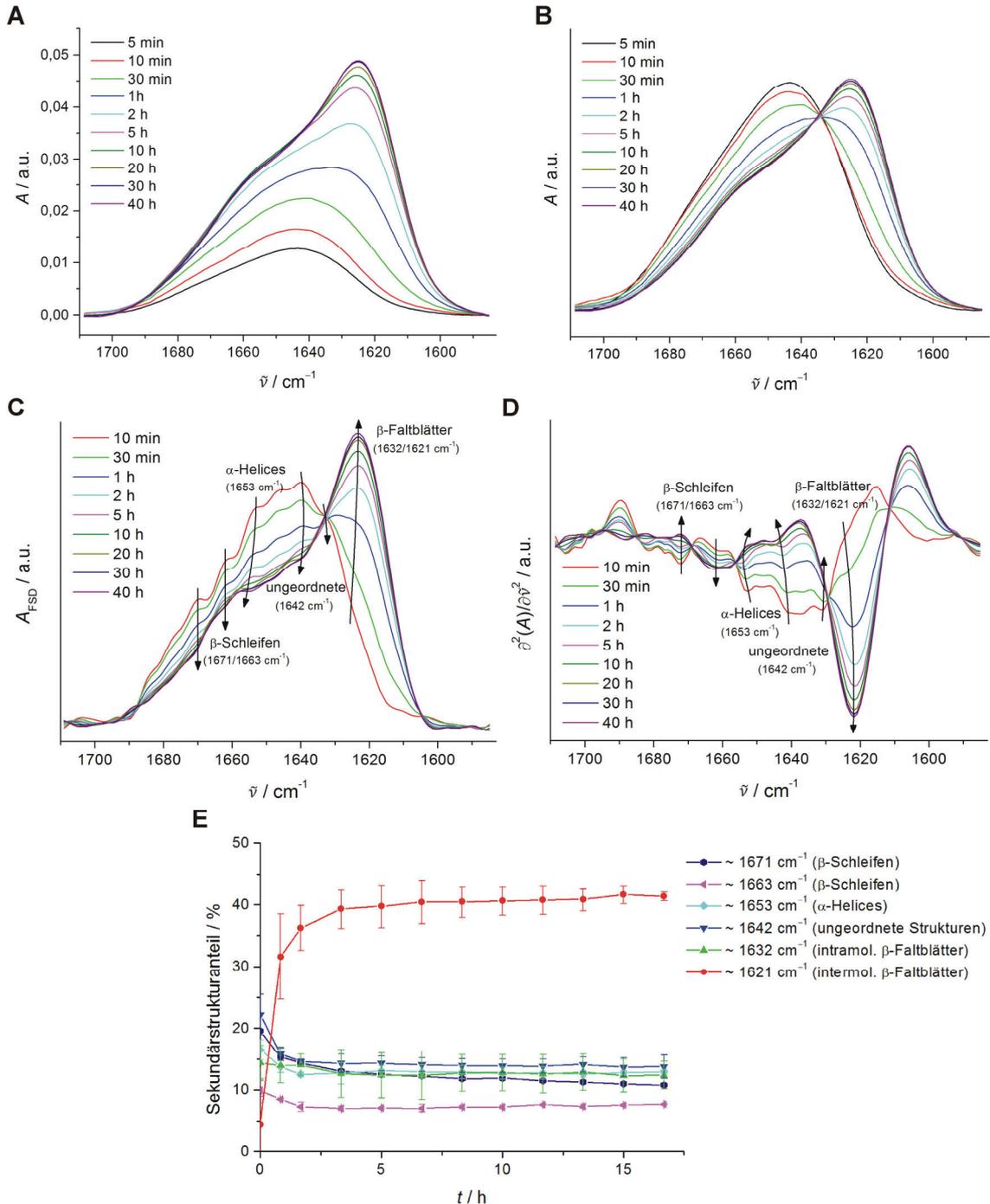


Abbildung 3.6: Zeitliche Veränderung der Sekundärstruktur des hIAPP in Folge der Aggregation an der isolierten β -Zellmembran. **A** Primäre ATR-FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des hIAPP ($c = 3 \mu\text{M}$) nach Puffer- und Basislinienkorrektur während der Inkubation an einer Membran der isolierten β -Zellmembranlipide in einer ATR-FTIR-Zelle bei 25 °C. **B** Flächennormierung der in **A** gezeigten Spektren zur besseren Visualisierung der Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande. **C** FOURIER *self deconvolution* und **D** zweite Ableitung der flächennormierten Spektren. **E** Aus der Bandenanalyse ermittelte zeitliche Änderung der Sekundärstrukturanteile des hIAPP. Nachdruck aus Ref. [140].

Die Sekundärstrukturanteile dieser hIAPP-Konformation stehen in guter Übereinstimmung mit Werten, die durch ATR-FTIR-Spektroskopie des hIAPP in Anwesenheit anderer neutraler und anionischer, homo- oder heterogener Modellmembranen bestimmt worden sind [45,136]. Die Sekundärstrukturumwandlung erfolgt von dieser initialen

hIAPP-Konformation zu einer Struktur, die nach ~ 3 h hauptsächlich aus intermolekularen β -Faltblättern ($\sim 40\%$) besteht, und somit auf die Aggregation des hIAPP hinweist. Die Bildung der β -Faltblätter während der Aggregation erfolgt strukturell gesehen auf Kosten von ungeordneten Strukturen, α -Helices und β -Schleifen, wobei die Bildung eines isosbestischen Punktes auf eine direkte Konformationsänderung mit hoher Kooperativität, d. h. ohne die wesentliche Ausbildung von Intermediaten mit anderen Sekundärstrukturen, hindeutet. Weiterhin wird durch den ermittelten Anteil an α -Helices und durch die Beobachtung der Abnahme dieser α -helikalen Strukturen im Verlauf der Aggregation der bereits zuvor vorgeschlagene Mechanismus, dass die Konformationsumwandlung des hIAPP in Gegenwart von Membranen über α -helikale Konformationen verläuft, auch an der β -Zellmembran bestätigt [74,147].

3.1.4 Permeabilisierung der isolierten β -Zellmembran durch hIAPP

Da besonders die Permeabilisierung zellulärer Membranen für die Toxizität des hIAPP im Organismus verantwortlich gemacht wird (vgl. Kapitel 1.3.3), wurde auch dieses Verhalten gegenüber der isolierten β -Zellmembran untersucht. Dazu wurden GUV aus den β -Zelllipiden gebildet, die den wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 ($c = 5 \mu\text{M}$) in Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,4) im Inneren enthielten, wobei die Lipide selbst durch Zugabe von 0,2 mol% des fluoreszenzmarkierten Lipids *N*-Rh-DHPE markiert wurden (Abb. 3.7, $t = 0$ min). Zur fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung des hIAPP wurde dieses C-terminal über einen zusätzlichen Lysinrest mit dem Fluorophor BODIPY FL markiert. Bei Zugabe einer $5 \mu\text{M}$ Lösung von hIAPP-K-BODIPY FL in Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,4) zu den GUV aus β -Zelllipiden kommt es zur sofortigen und nahezu vollständigen Anlagerung des Peptids an der Vesikelmembran (vgl. Abb. 3.7, $t = 5$ min). Innerhalb der nächsten Minuten der Inkubation erhöht sich die Menge des hIAPP an der Membran weiter und führt zur Permeabilisierung der β -Zellmembran, sodass der fluoreszierende Puffer bis zum Zeitpunkt $t = 10$ min vollständig aus den Vesikeln ausgetreten ist. Dennoch sind selbst nach einer Inkubationszeit von 40 min sowohl Aggregate des hIAPP als auch der Zellmembran in vesikelartiger Form vorhanden, welches auf eine Inkorporation der Lipide in die wachsenden Peptidaggregate schließen lässt. Allerdings werden auch Aggregate beider Komponenten separat in Lösung detektiert. Es konnte somit gezeigt werden, dass hIAPP in der Lage ist, auch die isolierte β -Zellmembran zu permeabilisieren.

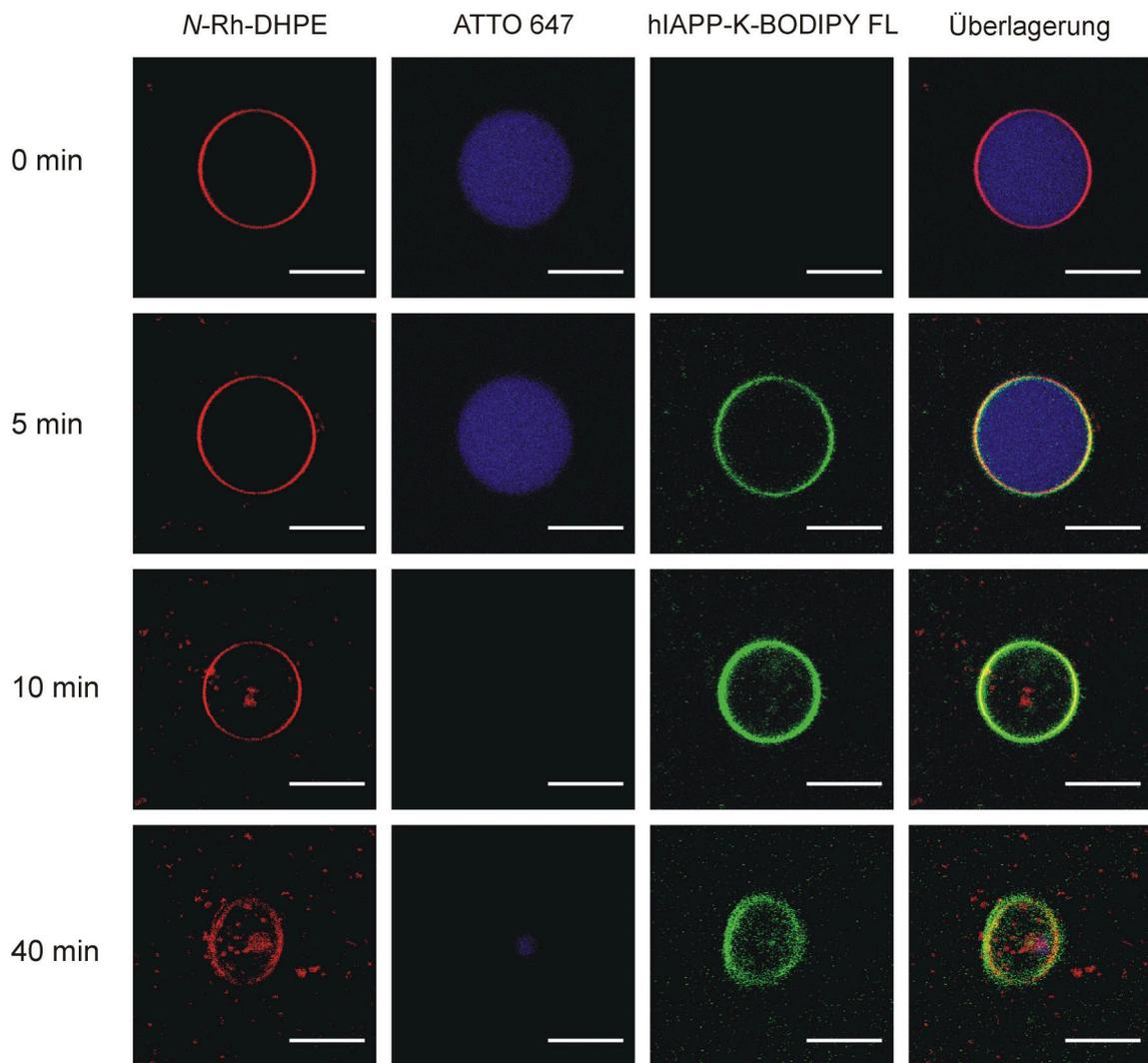


Abbildung 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Permeabilisierung der β -Zellmembran durch hIAPP. Zeitabhängige Interaktion von $5 \mu\text{M}$ hIAPP-K-BODIPY FL (grün) mit N -Rh-DHPE-markierten GUVs der isolierten β -Zellmembran (rot), die mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 gefüllt sind (blau). Die Maßstäbe repräsentieren jeweils $10 \mu\text{m}$. Nachdruck aus Ref. [140].

3.1.5 Zusammenfassung und Diskussion

Um in dieser Studie Erkenntnisse über die hIAPP-Aggregation in Anwesenheit einer physiologisch relevanten, komplexen, zellulären Lipidmembran im Vergleich zu verschiedenen Modellmembranen zu erlangen, wurden die Zellmembranlipide einer pankreatischen β -Zelllinie der Ratte (Zelllinie INS-1E) isoliert. Die massenspektrometrische Charakterisierung dieser zellulären Lipidmischung ergab 280 verschiedene identifizierte Lipidspezies. Als Hauptbestandteil der Lipidkopfgruppen der isolierten Lipide stellte sich das zwitterionische Phosphatidylcholin heraus; lediglich $\sim 2,5 \text{ mol}\%$ negativ geladene Kopfgruppen wurden detektiert. Als häufige Kombination der Fettsäureketten treten dabei wahrscheinlich Palmitoyloctadecanoylphospholipide (Fettsäureketten (16:0) und (18:1)) bzw. Dioctadecanoylphospholipide (zwei Fettsäureketten mit (18:1)) auf. Über temperaturabhängige FTIR-Spektroskopie sowie

Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese zelluläre Lipidmembran bei Raumtemperatur in einer flüssig-ungeordneten Lipidphase vorliegt. Diese Ergebnisse stimmen weitestgehend mit den Analysen von Phospholipiden aus pankreatischen Inseln von Mäusen und Ratten überein [144–146], sodass das isolierte Lipidsystem als geeignetes Modell der pankreatischen β -Zellmembran angesehen werden kann. Es bietet somit die Möglichkeit, zum einen Messungen *in vitro*, die am Zellsystem selbst nicht möglich sind, durchzuführen und zum anderen eine deutlich höhere Komplexität und damit biologische Relevanz als einfache Modellmembransysteme.

Obwohl die isolierte zelluläre Membran im Vergleich zu den verwendeten Modellmembranen einen deutlich geringeren Anteil an negativ geladenen Lipidkopfgruppen aufweist, haben Interaktionsstudien mit humanem IAPP eine signifikante Beschleunigung der Aggregation und Fibrillenbildung offenbart. Neben den teilweise negativ geladenen Kopfgruppen der β -Zelllipide müssen demnach noch weitere Faktoren für die beschleunigte Aggregation verantwortlich sein. Studien der hIAPP-Aggregation in Anwesenheit von zwitterionischen und negativ geladenen Modellmembranen, die Phasenkoexistenz von flüssig-geordneter und flüssig-ungeordneter Phase aufweisen, haben bereits gezeigt, dass auch Membranheterogenitäten zur Beschleunigung der Fibrillenbildung beitragen können [136,138]. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die isolierte β -Zellmembran Heterogenitäten auf Lipidmolekülebene sowie Defektzustände der gebildeten Membran aufweist, obwohl weder in fluoreszenz- noch in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen Lipidphasenkoexistenz in Form von größeren Lipiddomänen detektiert werden konnte. Auch die deutlich stärkere Adsorption des hIAPP an die isolierte β -Zellmembran könnte in der wesentlich komplexeren Zusammensetzung der zellulären Membran gegenüber den Modellmembranen begründet liegen. Aufgrund der Unterschiede in Art und Kettenlänge der zellulären Lipide kommt es zu einer höheren Rauigkeit und Heterogenität der Membran auf Einzelmolekülebene. In diesem Fall scheinen, neben elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem dreifach positiv geladenen N-terminalen Bereich des hIAPP und den negativ geladenen Lipidkopfgruppen der β -Zellmembran, auch hydrophobe Wechselwirkungen und hydrophober *mismatch* an Phasengrenzen für die schnelle Adsorption des hIAPP an die Lipidgrenzfläche, die damit einhergehende lokale Konzentrationserhöhung und folglich die beschleunigte hIAPP-Aggregation verantwortlich zu sein. Der hydrophobe *mismatch* an Grenzflächen bewirkt, dass die Peptidinsertion an diesen Grenzflächen durch Herabsetzung der energetisch ungünstigen Grenzflächenenergie begünstigt wird.

Die Sekundärstrukturumwandlung des hIAPP während seiner Aggregation in Anwesenheit der isolierten β -Zellmembran verläuft weitestgehend identisch zum

Aggregationsverhalten an anionischen Modellmembranen. Ausgehend von einer hIAPP-Konformation, die unmittelbar nach der Adsorption an die β -Zellmembran aus ungeordneten Strukturen, β -Schleifen und α -Helices besteht, erfolgt die sofortige Umwandlung zu einer Struktur, die reich an intermolekularen β -Faltblättern ist, und somit auf eine rapide Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP hinweist. Die Konformationsänderung des hIAPP ist dabei hoch kooperativ und verläuft ohne wesentliche Ausbildung von Intermediaten mit anderen als β -faltblattreichen Sekundärstrukturen. Weiterhin erfolgt die Aggregation, strukturell gesehen, auf Kosten der Abnahme der α -helikalen Strukturen, die bei der Adsorption des hIAPP an die Membran transient entstanden sind. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in früheren Studien für die Interaktion von hIAPP mit anionischen Modellmembranen gefunden [20,77,78,136,147,148]. Diese Resultate haben zur Postulierung eines mehrstufigen Aggregationsmechanismus des hIAPP geführt, bei dem der Insertion des positiv geladenen N-terminalen Bereichs des hIAPP in die Bereiche der Lipidkopfgruppen und oberen Lipidfettsäureketten der anionischen Membran die rapide Konformationsumwandlung, ausgehend von ungeordneten über α -helikale Strukturen zu der finalen β -Faltblattkonformation, folgt [20,77,147,148]. Dieser Mechanismus scheint demnach auch für das Aggregationsverhalten des hIAPP an der isolierten β -Zellmembran verantwortlich zu sein. Des Weiteren könnte dieser Mechanismus, bei dem die nach außen hydrophoben, unmittelbar nach der Adsorption vorhandenen, α -helikalen Oligomere als toxische Spezies angenommen werden [74,75], auch für die in den fluoreszenzmikroskopischen Permeabilisierungs-Assays beobachtete schnelle Zerstörung der β -Zellmembran verantwortlich sein. Weiterhin scheint aber auch die Umwandlung der oligomeren Spezies zu fibrillären Strukturen und die damit einhergehende Lipidinkorporation in die Fibrillen zur Membrandesintegration zu führen. Somit beruht der hier beobachtete Mechanismus wahrscheinlich auf einer Kombination der in der Einleitung beschriebenen Permeabilisierungsmechanismen durch hydrophobe Oligomere und das Fibrillenwachstum innerhalb der Membran (vgl. Kapitel 1.3.3, Abb. 1.4B und C).

Die Membraninteraktionsstudien mit hIAPP haben gezeigt, dass einige Modellmembransysteme durchaus in der Lage sind, einzelne, die Aggregation des hIAPP beeinflussende Komponenten, wie Ladung oder Heterogenität, abzubilden. Hier sticht vor allem die bereits etablierte heterogene anionische *raft*-Modellmembran hervor, die den Einfluss der isolierten β -Zellmembran in Bezug auf die Aggregationskinetiken sehr gut widerspiegelt. Die vollständige Komplexität eines zellulären Membransystems aus mehreren hundert Komponenten und die damit einhergehenden Effekte der Heterogenität auf Einzelligipidebene können sie allerdings nicht darstellen. Auch die isolierte β -Zellmembran ist noch kein Modell, mit dem der hIAPP-Aggregationsmechanismus, die damit einhergehende Zerstörung der pankreatischen β -Zellmembran,

sowie die Zelltoxizität vollständig aufgeklärt werden können. Es sind weder Proteine, die bei der Initiation der Aggregation eine Rolle spielen könnten, vorhanden, noch weisen die aus den isolierten Lipiden geformten Membranen eine Asymmetrie von innerer und äußerer Lipidschicht auf, wie viele zelluläre Membranen. Um die gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen und auf Zellsysteme oder ganze Organismen übertragen zu können, müssten demnach weitere Studien der hIAPP-Aggregation an Zellmembranen *in vivo* bzw. *in cellulo* durchgeführt werden. Ein nächster Schritt könnte dazu die Mikroinjektion des hIAPP in Zellen der pankreatischen β -Zelllinie INS-1E sein. Mittels Fluoreszenzmikroskopie könnte dadurch möglicherweise die Adsorption des hIAPP an die Innenseite der Plasmamembran oder andere zelluläre Membranen sowie die anschließende Permeabilisierung der Membranen, gefolgt von einem Austritt des hIAPP aus der Zelle, beobachtet werden. Mit einer solchen Studie könnte auch die Hypothese der innerhalb der Zelle beginnenden und nach außen fortschreitenden hIAPP-Aggregation (vgl. Kapitel 1.3.3) überprüft werden.

3.2 Kreuz-Interaktion von hIAPP und Amyloid β^*

3.2.1 Hintergrund, Motivation und Zielsetzung

Klinische Studien haben zu der Annahme geführt, dass es einen Zusammenhang zwischen den Proteinaggregationskrankheiten Typ II Diabetes mellitus und Alzheimer geben könnte, da Typ II Diabetiker mit einem höheren Risiko auch an Alzheimer erkranken und *vice versa* [149–151]. Beide Krankheiten beruhen auf der lokalen, extrazellulären Anhäufung von amyloiden Fibrillen und einer damit einhergehenden Zelldegeneration [13–15,152]. Ähnlichkeiten bestehen auch auf molekularer Ebene. So handelt es sich bei den Schlüsselmolekülen der Krankheiten – hIAPP und Amyloid β ($A\beta$) – um zwei kurze, nativ ungeordnete und konformativ flexible Polypeptide, die stark zur Aggregation neigen [24,25,152]. Die Sequenzen von hIAPP und $A\beta$ sind zu 25% identisch und zu 50% ähnlich (Abb. 3.8) [153]. Der größte Anteil an identischen und ähnlichen Aminosäuren wird dabei innerhalb der kurzen Sequenzen hIAPP(10-16) und $A\beta$ (15-21) sowie hIAPP(21-27) und $A\beta$ (26-32) beobachtet, die zumindest teilweise an der Selbstassoziation von hIAPP und $A\beta$ beteiligt sein sollen [154].

* Die Ergebnisse dieser Studie wurden in den Referenzen [138] und [140] veröffentlicht und werden in diesem Kapitel teilweise wiedergegeben.

[138] Reprinted from Seeliger, J., Evers, F., Jeworrek, C., Kapoor, S., Weise, K., Andreetto, E., Tolan, M., Kapurniotu, A., & Winter, R. (2012) Cross-Amyloid Interaction of $A\beta$ and IAPP at Lipid Membranes, *Angew Chem Int Ed* **51**, 679–683, Copyright © 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

[140] Reprinted from Seeliger, J., Weise, K., Opitz, N., & Winter, R. (2012) The Effect of $A\beta$ on IAPP Aggregation in the Presence of an Isolated β -Cell Membrane, *J Mol Biol* **421**, 348–363, Copyright (2013), with permission from Elsevier.



Abbildung 3.8: Vergleich der Primärstrukturen von hIAPP und A β 40 (bzw. A β 42). Identische Aminosäuren beider Sequenzen sind rot, ähnliche Aminosäuren blau hervorgehoben [153]. (+/-) Ladung der Aminosäureseitenketten und Termini bei pH 7,0. Modifizierter Nachdruck aus Ref. [138].

Bei A β selbst handelt es sich um ein aus 40 oder 42 Aminosäuren (A β 40/A β 42) bestehendes Fragment des **Amyloid-Precursor-Proteins (APP)**. APP ist ein integrales Membranprotein, welches über zwei verschiedene Wege posttranslational prozessiert werden kann (Abb. 3.9). Das Enzym α -Sekretase initialisiert dabei den nicht-amyloidogenen Prozessierungspfad durch die Spaltung des APP innerhalb der A β -Sequenz, wodurch die Bildung von A β ausgeschlossen wird. Diese Spaltung des APP führt zum α -sekretierten **APP (sAPP α)** und zu einem verbleibenden, membran-gebundenen α -C-terminalen **Fragment (α -CTF)**. Alternativ führt die Spaltung des APP durch die β -Sekretase zur Bildung von A β und damit zum amyloidogenen Prozessierungspfad. Durch diese Spaltung entsteht β -sekretiertes **APP (sAPP β)** und das β -C-terminale **Fragment β -CTF**. Beide C-terminalen Fragmente des APP sind Substrate der γ -Sekretase. Diese spaltet α -CTF zum nicht-amyloidogenen Peptid p3 und β -CTF zum amyloidogenen A β , der Hauptkomponente der amyloiden Plaques bei Alzheimer-Patienten. Da das β -CTF-Fragment an verschiedenen Stellen durch die γ -Sekretase gespalten werden kann, variiert die Länge der entstehenden A β -Peptide. Hauptsächlich werden allerdings das 40 Aminosäurereste umfassende A β 40 und das zwei Aminosäuren längere A β 42 produziert. [152,155]

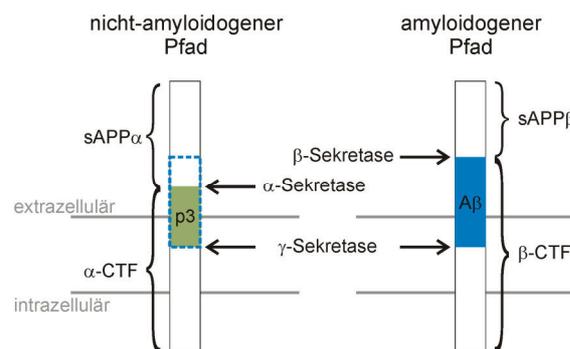


Abbildung 3.9: Nicht-amyloidogene und amyloidogene Prozessierung des APP durch α -, β - und γ -Sekretasen. Die mit der Alzheimerkrankheit assoziierten Peptide A β 40 bzw. A β 42 werden über den amyloidogenen Prozessierungspfad gebildet.

Der β -sekretorische Weg der APP-Prozessierung ist in Neuronen dominanter als in anderen Geweben, d. h. Neuronen produzieren generell eine signifikante Menge an A β [156]. Durch Analyse von Mutationen in APP und Proteinen des γ -Sekretase-Enzymkomplexes wurde die Vermutung bestärkt, dass schon ein leichter Anstieg dieses A β -Niveaus ausreicht, um zur Aggregation des Peptids zu führen und die Alzheimer-

krankheit auszulösen [157]. Aufgrund der Abspaltung des A β vom APP an der Plasmamembran wird auch der Wechselwirkung mit Membranen eine Rolle bei der Aggregation des A β eingeräumt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass aus humanen neuronalen Zellen extrahierte Membranlipide die Bildung von A β -Fibrillen beschleunigen und dass die Zusammensetzung der Membranlipide die A β -Lipid-Wechselwirkung sowie die Aggregationskinetik kontrolliert [158,159]. Die Ladung der Lipidkopfgruppen spielt dabei eine besondere Rolle. Die Anwesenheit anionischer Lipide fördert, ähnlich wie bei der Aggregation des hIAPP, die Interaktion des A β mit der Membran und induziert die Bildung von β -Faltblättern und A β -Fibrillen [160–162]. Wie im Fall des hIAPP scheinen allerdings auch für die Toxizität des A β nicht die gebildeten Fibrillen sondern vielmehr oligomere Strukturen verantwortlich zu sein. Ein vorgeschlagener Mechanismus für die Neurotoxizität des A β ist, analog zu beschriebenen Mechanismen der hIAPP-Toxizität, die Depolarisierung und Zerstörung der neuronalen Zellmembran [162,163]. Der genaue Mechanismus ist allerdings auch hier noch nicht aufgeklärt.

Über verschiedene Wechselwirkungen zwischen den sowohl strukturell als auch in ihren Aggregations- und Toxizitätsmechanismen sehr ähnlichen Peptiden hIAPP und A β wurde bereits berichtet [138,153,164]. Es konnte beobachtet werden, dass amyloide Fibrillen des A β 40 als Nukleationskeime der Fibrillenbildung des hIAPP fungieren können [153]. Weiterhin wurden frühe, nicht-fibrilläre und nicht-toxische hIAPP- und A β 40-Spezies nachgewiesen, die in der Lage sind, die zytotoxischen Amyloidbildungsprozesse des jeweils anderen Polypeptids für einen gewissen Zeitraum zu unterdrücken, aber nicht zu verhindern [164]. Der Einfluss einer anionischen *raft*-Modellmembran auf die Heteroassoziation von hIAPP und A β wurde im Rahmen meiner Masterarbeit [139] mittels ATR-FTIR-Spektroskopie studiert. Dabei wurde auch in Anwesenheit der Modellmembran eine gemeinsame Aggregation der beiden Peptide, wie sie bereits in Lösung beschrieben wurde, detektiert. Im Vergleich zu reinem hIAPP verläuft die Aggregationskinetik der hIAPP/A β -Mischung zu β -Faltblättern und amyloiden Fibrillen allerdings verlangsamt. Die detektierte Struktur der Heteroaggregate wurde als der Struktur von reinen hIAPP-Fibrillen ähnlich und deutlich unterschiedlich zur reinen A β -Fibrillenstruktur beschrieben [138]. Diese Befunde haben zu der Hypothese geführt, dass die hIAPP/A β -Heteroassoziation den molekularen Zusammenhang zwischen den Erkrankungen Typ II Diabetes mellitus und Alzheimer darstellen könnte. Um genauere Einblicke in die Heterointeraktion der beiden Peptide und den Einfluss auf die Permeabilisierung der Zellmembran, welche im Fall beider Peptide für die Zelltoxizität verantwortlich gemacht wird, zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopische Permeabilisierungs-Assays, sowie ATR-FTIR-spektroskopische Studien durchgeführt. In beiden Fällen wurde die in Kapitel 3.1.2 beschriebene, isolierte β -Zellmembran als physiologisch relevantes Membranmodell

verwendet. Weitere Einblicke in die Morphologie der Heteroaggregate wurden durch AFM-Messungen erzielt. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Hetero- und Selbstassoziation von hIAPP und A β ist von großer biomedizinischer Bedeutung, da hierdurch einerseits mögliche Verbindungen dieser Prozesse mit der Krankheitspathogenese aufgedeckt werden können und andererseits die Möglichkeit zur Entwicklung gezielter Therapeutika bestände.

3.2.2 Modifikation der hIAPP Aggregation durch A β

Änderungen der Sekundärstrukturelemente während der Aggregation einer Mischung aus hIAPP und A β in Anwesenheit der isolierten β -Zellmembran wurden über die oberflächenempfindliche ATR-FTIR-Spektroskopie ermittelt. Die zeitabhängige Sekundärstrukturänderung des reinen hIAPP an dieser Membran wurde bereits detailliert im vorherigen Kapitel 3.1.3 beschrieben. Es konnte eine rapide Adsorption des hIAPP an die β -Zellmembran unter Änderung der Sekundärstruktur von einer überwiegend ungeordneten, partiell α -helikalen zu einer stark von intermolekularen β -Faltblättern dominierten Struktur beobachtet werden. Die Strukturumwandlung verläuft dabei als hoch kooperativer Prozess unter Ausbildung eines isosbestischen Punktes in den ATR-FTIR-Spektren. Die Ergebnisse einer Vergleichsmessung des reinen A β an der β -Zellmembran sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

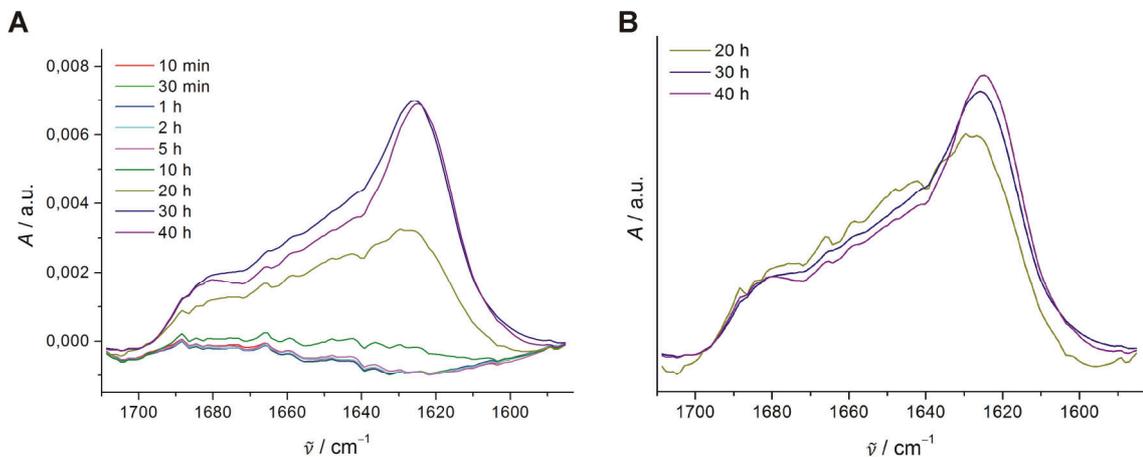


Abbildung 3.10: Zeitliche Veränderung der Sekundärstruktur des A β in Folge der Aggregation an der isolierten β -Zellmembran in einer ATR-FTIR-Zelle bei 25 °C. **A** Primäre ATR-FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande des A β ($c = 3 \mu\text{M}$) nach Puffer- und Basislinienkorrektur. **B** Flächennormierung der in **A** gezeigten Spektren zur besseren Visualisierung der Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande. Nachdruck aus Ref. [140].

Auch für diese Messung wurden die isolierten β -Zelllipide auf dem internen Reflexions-element (Ge-Kristall) der ATR-Zelle gespreitet und nach anschließender Zugabe einer 3 μM A β -Lösung in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , pD 7,4 in D_2O) wurde die Adsorption an die Membran sowie die Sekundärstrukturänderung des A β zeitabhängig verfolgt. Im Gegensatz zur relativ schnellen Adsorption des hIAPP an die isolierte β -Zellmembran

konnte im Fall des A β erst nach einer Inkubation von ~20 h eine ausgeprägte Amid-I'-Bande detektiert werden, welches als sehr langsame Adsorption interpretiert werden kann. Selbst nach 40 h Inkubation ist das Signal der Amid-I'-Bande noch immer um das etwa 8-fache geringer als das Signal der Bande des hIAPP zum selben Zeitpunkt. Diese Adsorptionsunterschiede des hIAPP und A β an die 2,5 mol% negativ geladene Lipidkopfgruppen enthaltende β -Zellmembran können auf die unterschiedlichen Nettoladungen der Peptide, die bei neutralem pH positiv für hIAPP und negativ für A β ausfallen, zurückgeführt werden. Somit kann zunächst scheinbar nur hIAPP elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran eingehen. Die spätere Interaktion des amphiphilen und drei positive Ladungen enthaltenden A β mit der Membran wird wahrscheinlich durch seinen hydrophoben C-Terminus und die Orientierung der positiv geladenen Aminosäuren in Richtung der Membranoberfläche initialisiert. Aufgrund dieser schwachen Adsorption an die Membran ist die Analyse der Sekundärstruktur und vor allem der Sekundärstrukturänderung schwierig. Dennoch ist in der Zeitspanne von 20-40 h ein leichter Anstieg der Intensität der Amid-I'-Bande bei $\sim 1625\text{ cm}^{-1}$ zu verzeichnen (Abb. 3.10B), der auf eine Zunahme des Anteils an β -Faltblättern an der Peptidstruktur und damit die Aggregation des A β hindeutet.

Die Ergebnisse der ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchung einer äquimolaren Mischung aus hIAPP und A β (je $c = 3\ \mu\text{M}$ in 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4 in D_2O) an der isolierten β -Zellmembran sind in Abbildung 3.11 gezeigt. Während der Inkubation für 40 h wurde eine sehr langsame Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von 1644 cm^{-1} zu 1634 cm^{-1} beobachtet. Durch Bildung der FSD und der zweiten Ableitung der flächennormierten Spektren konnten sieben Subbanden für die Sekundärstrukturanalyse durch Bandenanpassung ermittelt werden (vgl. Abb. 3.11C und D). Unter der vereinfachten Annahme, dass die Übergangsdipolmomente der unterschiedlichen Konformere gleich sind, lässt sich aus der Bandenanpassung der Amid-I'-Bande mit den zugeordneten Subbanden eine Umwandlung der Sekundärstruktur der hIAPP/A β -Mischung von einer anfänglich hauptsächlich aus intramolekularen β -Faltblättern (~22%) und α -Helices (~18%) bestehenden Struktur hin zu einer an intermolekularen β -Faltblättern reichen Konformation (~33%) ermitteln (Abb. 3.11E). Im Vergleich zur spontanen Aggregation des reinen hIAPP erfolgt diese Umwandlung allerdings verzögert. Folglich scheint die Bildung eines Heterokomplexes aus hIAPP und A β stattzufinden, dessen Aggregation im Vergleich zu der des reinen hIAPP verlangsamt abläuft. Darüber hinaus scheint der Aggregationsprozess dieses Heterokomplexes einem ähnlichen Mechanismus wie die Aggregation des reinen hIAPP zu folgen, da sich ebenfalls alle normierten Spektren der hIAPP/A β -Aggregation in einem isosbestischen Punkt bei ähnlicher Wellenzahl ($\sim 1636\text{ cm}^{-1}$) kreuzen. Die Adsorption der hIAPP/A β -Mischung an die isolierte β -Zellmembran ist nach ~5 h abgeschlossen und dauert somit

nur unwesentlich länger als die Adsorption des reinen hIAPP, ist aber signifikant schneller als die des A β .

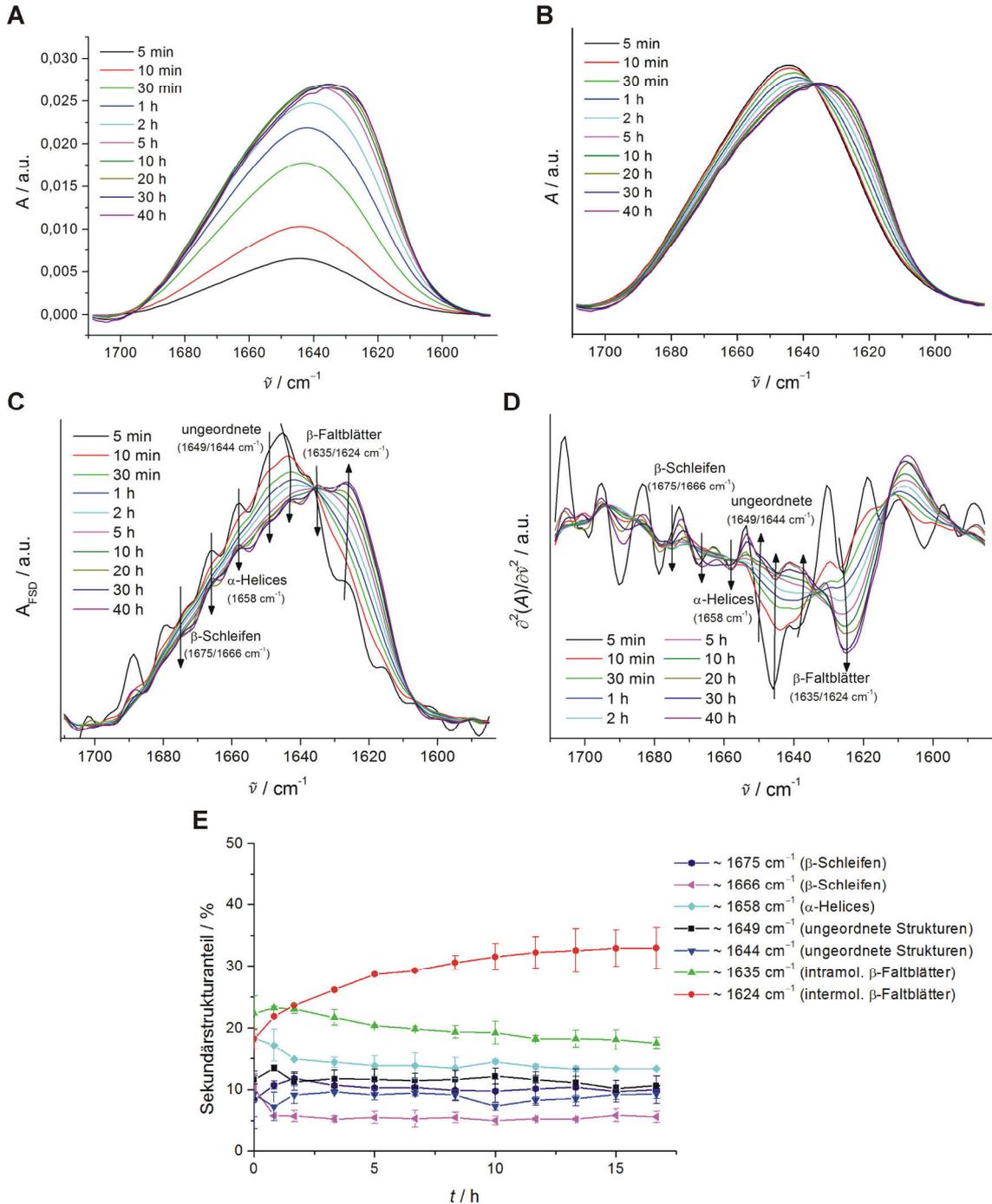


Abbildung 3.11: Zeitliche Veränderung der Sekundärstruktur der äquimolaren hIAPP/A β -Mischung (je $c = 3 \mu\text{M}$) in Folge der Aggregation an der isolierten β -Zellmembran. **A** Primäre ATR-FTIR-Spektren der Amid-I'-Bande der Mischung nach Puffer- und Baselinienkorrektur während der Inkubation an einer Membran der isolierten β -Zellmembranlipide in einer ATR-FTIR-Zelle bei 25°C . **B** Flächennormierung der in **A** gezeigten Spektren zur besseren Visualisierung der Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande. **C** FOURIER *self deconvolution* (C) und zweite Ableitung (D) der flächennormierten Spektren. **E** Aus der Bandenanpassung ermittelte zeitliche Änderung der Sekundärstrukturanteile des hIAPP. Nachdruck aus Ref. [140].

3.2.3 Einfluss des A β auf die Membranpermeabilisierung

Um den Effekt der bei der gemeinsamen Inkubation und Aggregation von hIAPP und A β entstehenden Heterokomplexe auf die Permeabilisierung der isolierten β -Zellmembran zu untersuchen, wurden fluoreszenzmikroskopische Permeabilisierungs-Assays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden GUV aus den isolierten β -Zelllipiden hergestellt, die den wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 ($c = 5 \mu\text{M}$) in Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,4) im Inneren enthielten, wobei die Lipide selbst durch Zugabe von 0,2 mol% des fluoreszenzmarkierten Lipids *N*-Rh-DHPE markiert wurden (Abb. 3.12 und 3.13, $t = 0$ min). Zur fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung der Peptide wurde C-terminal mit dem Fluorophor BODIPY FL markiertes hIAPP und N-terminal entweder mit dem Fluorophor Fluorescein oder mit DAC (7-Diethylamino-coumarin) markiertes A β verwendet.

Die Ergebnisse zur hIAPP/Membraninteraktion und Permeabilisierung der GUV aus isolierten β -Zelllipiden durch hIAPP wurden bereits in Kapitel 3.1.4 im Detail beschrieben. Dabei wurde eine spontane Adsorption des hIAPP an die Membran, gefolgt von der Permeabilisierung der β -Zellmembran unter völligem Pufferaustritt innerhalb von 10 min detektiert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde für die Inkubation des Fluorescein-A β in Anwesenheit der GUV bestehend aus isolierten β -Zelllipiden zunächst eine homogene Verteilung des Peptids in der Pufferlösung rund um die Vesikel bei nur sehr geringer Akkumulation an der Lipidmembran detektiert (Abb. 3.12, $t = 10$ min und $t = 24$ h). Selbst nach einer Inkubation von 40 h ist die Fluoreszenz des markierten A β immer noch hauptsächlich in der Pufferlösung zu finden, obwohl es zu diesem Zeitpunkt bereits zur Permeabilisierung der Membran und zum Austritt des fluoreszenzmarkierten Puffers gekommen ist. Diese Tatsache kann mit der vorherrschenden Membranaktivität oligomerer A β -Spezies erklärt werden, deren Fluoreszenzintensität nur geringfügig höher erscheint als die Intensität der Peptide in Lösung, sodass keine deutlich höhere Fluoreszenzintensität an der Lipidmembran detektiert werden konnte. Höhere Fluoreszenzintensitäten des markierten A β , die auf Aggregat- oder Fibrillenbildung des Peptids hinweisen, konnten allerdings bei $t = 40$ h in Lösung detektiert werden (Abb. 3.12, Pfeile). Diese Ergebnisse stimmen mit den beschriebenen ATR-FTIR-spektroskopischen Daten überein, die ebenfalls die rapide Adsorption des hIAPP an die isolierte β -Zellmembran und nur eine geringe Membraninteraktion des A β zeigen.

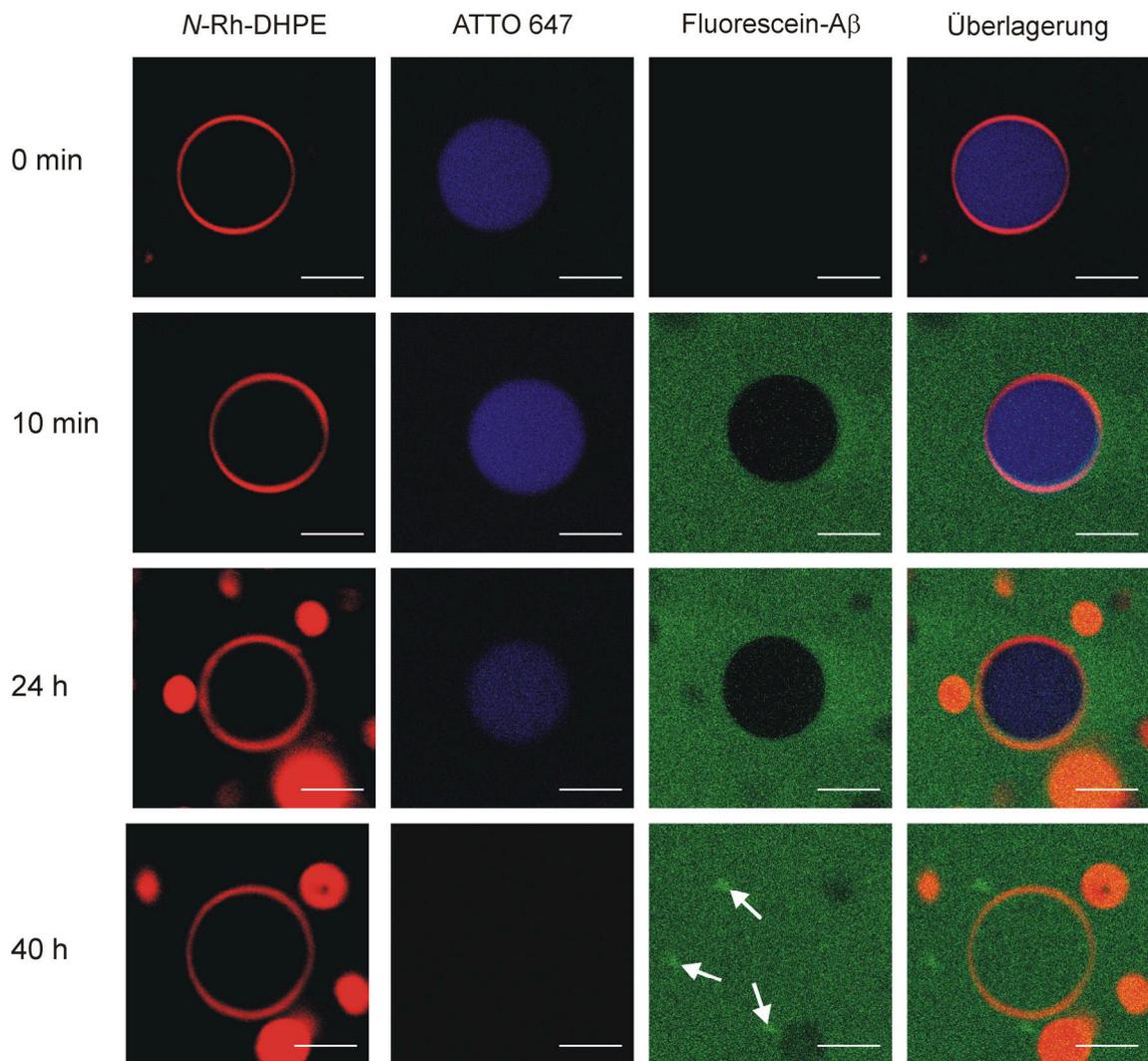


Abbildung 3.12: Interaktion von 5 μM Fluorescein-A β (grün) mit N-Rh-DHPE-markierten GUV der isolierten β -Zellmembran (rot), die mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 gefüllt sind (blau). Pfeile weisen auf in Lösung gebildete A β -Aggregate hin. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils 10 μm . Nachdruck aus Ref. [140].

Bei der Inkubation einer Mischung aus hIAPP und A β mit den GUV bestehend aus isolierten β -Zelllipiden konnte ebenfalls zu Beginn ($t = 7$ min) eine homogene Verteilung beider Peptide in Lösung detektiert werden (Abb. 3.13). Nach etwa 30 min war jedoch bereits eine erhöhte Peptidkonzentration an der Lipidmembran sichtbar. Diese membranassoziierte Peptidkonzentration erhöhte sich im Verlauf der Messung weiter, bis die Lipidmembran nach etwa 6 h permeabilisiert wurde und der innere Vesikelpuffer austrat. Um zu bestätigen, dass in diesem Fall beide Peptide – hIAPP und A β – an der β -Zellmembran lokalisiert sind, wurden weitere fluoreszenzmikroskopische Messungen unter Verwendung der getrennt detektierbaren fluoreszenzmarkierten Peptide hIAPP-K-BODIPY FL und DAC-A β durchgeführt. Die entsprechenden Bilder (Abb. 3.14) zeigten eine Kolo-kalisation von hIAPP und A β am Lipidvesikel. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass die hIAPP/A β -Interaktion in Lösung durch die Bildung von Heterokomplexen initialisiert wird. Diese hIAPP/A β -Heterokomplexe

neigen weiterhin zur Adsorption an die Oberfläche der isolierten β -Zellmembran und permeabilisieren diese nach einer gewissen Zeit. Allerdings wurden auch hier, ähnlich dem Verhalten des reinen A β , Aggregate in Lösung detektiert (Abb. 3.13, Pfeile).

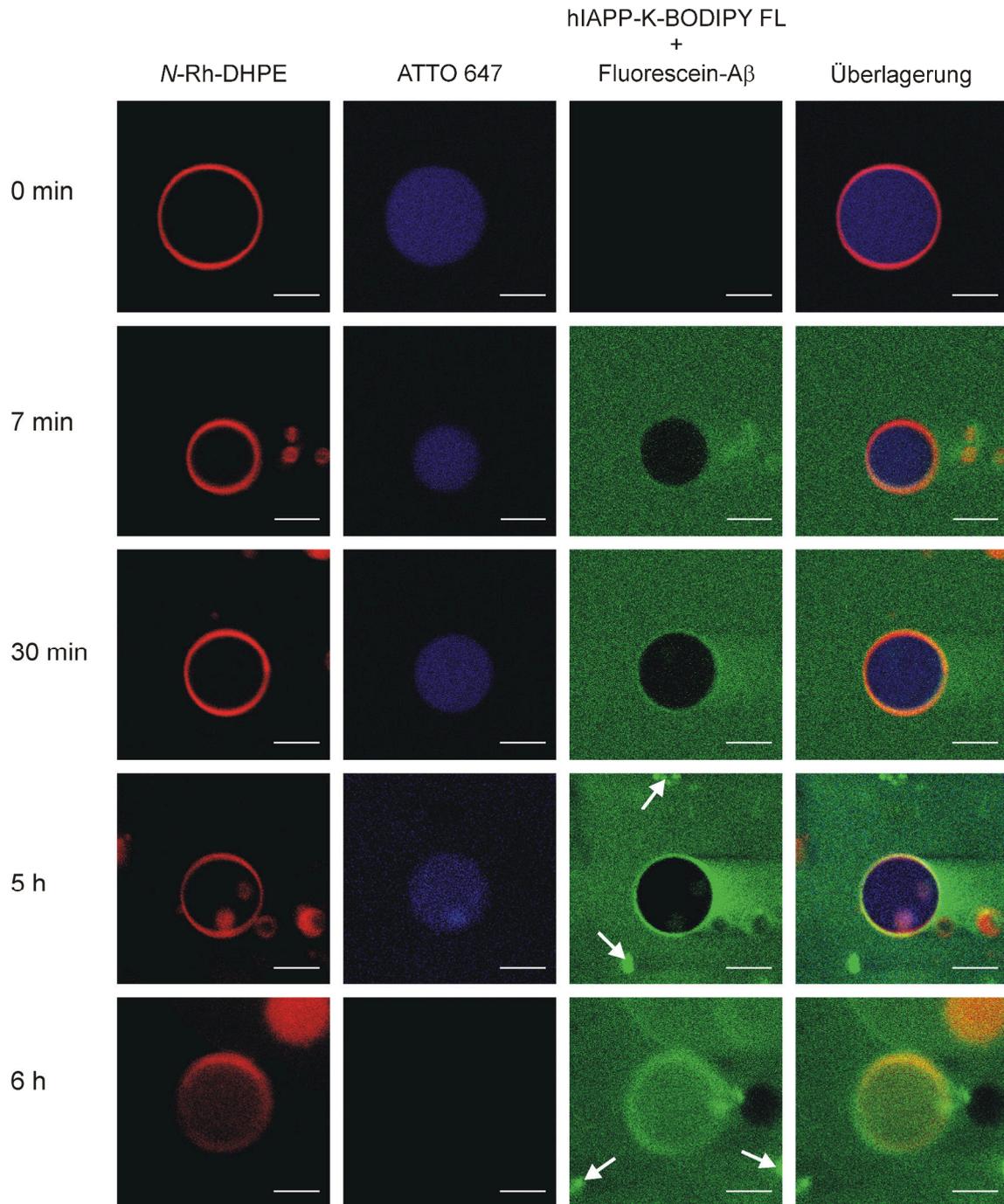


Abbildung 3.13: Der Effekt einer Mischung aus hIAPP-K-BODIPY FL und Fluorescein-A β (je $c = 5 \mu\text{M}$; grün) auf Vesikel bestehend aus mit ATTO 647 (blau) gefüllten und mit N-Rh-DHPE markierten β -Zellmembranlipiden (rot). Pfeile deuten auf hIAPP/A β -Aggregate in Lösung. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils $10 \mu\text{m}$. Nachdruck aus Ref. [140].

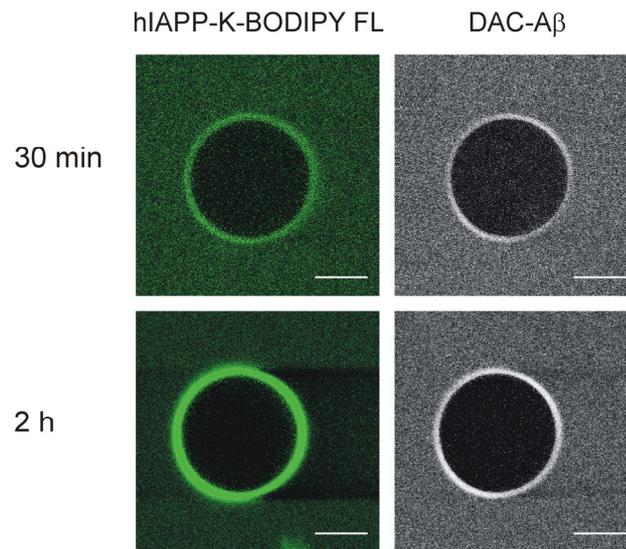


Abbildung 3.14: Lokalisation von hIAPP-K-BODIPY FL ($c = 5 \mu\text{M}$; grün) und DAC-A β ($c = 5 \mu\text{M}$; grau) in Anwesenheit von Vesikeln der β -Zellmembran. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils $10 \mu\text{m}$. Nachdruck aus Ref. [140].

3.2.4 Morphologie der hIAPP/A β -Heteroaggregate

Zur Bestimmung der Morphologie und Art – Oligomere, Protofibrillen oder gereifte Fibrillen – der gebildeten hIAPP/A β -Heteroaggregate wurden AFM-Messungen herangezogen. Die experimentelle Durchführung dieser Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Katrin Weise (Postdoktorandin am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I). Es wurde die Aggregation beider Peptide einzeln, sowie als äquimolare Mischung in Puffer ($10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4) auf der negativ geladenen Glimmeroberfläche zeitabhängig beobachtet. Diese Messungen konnten nicht an der isolierten β -Zellmembran durchgeführt werden, da vorherige Studien bereits gezeigt haben, dass hIAPP-Oligomere für die sofortige Zerstörung von auf Glimmer gespreiteten Lipidmembranen sorgen [31]. Die zeitabhängigen Aufnahmen der Messungen einer äquimolaren hIAPP/A β -Mischung (Abb. 3.15) zeigen die Bildung erster kurzer amyloider Fibrillen nach einer Inkubationszeit von $\sim 3 \text{ h}$; allerdings sind diese im Vergleich zu Oligomeren und kurzen Protofibrillen zu diesem Zeitpunkt deutlich in der Minderheit. Erste detektierte Oligomere weisen eine mittlere Höhe von $1,05 \pm 0,40 \text{ nm}$ auf (vgl. auch Abb. A.2 im Anhang). Im Verlauf der Zeit nimmt der Anteil an Protofibrillen und gereiften Fibrillen deutlich zu und es kann die Verlängerung von Fibrillen beobachtet werden. Nach etwa 24 h , als eine ausreichende Menge an Fibrillen vorhanden war, wurde die Probe zur weiteren Charakterisierung der hIAPP/A β -Heterofibrillen getrocknet. Zum Vergleich wurden unter den gleichen Bedingungen auch Proben der reinen Peptide – hIAPP und A β – hergestellt. Weitere Aufnahmen zeitabhängiger Messungen der einzelnen Peptide sowie der äquimolaren hIAPP/A β -Mischung sind im Anhang in Abbildung A.2 zu finden.

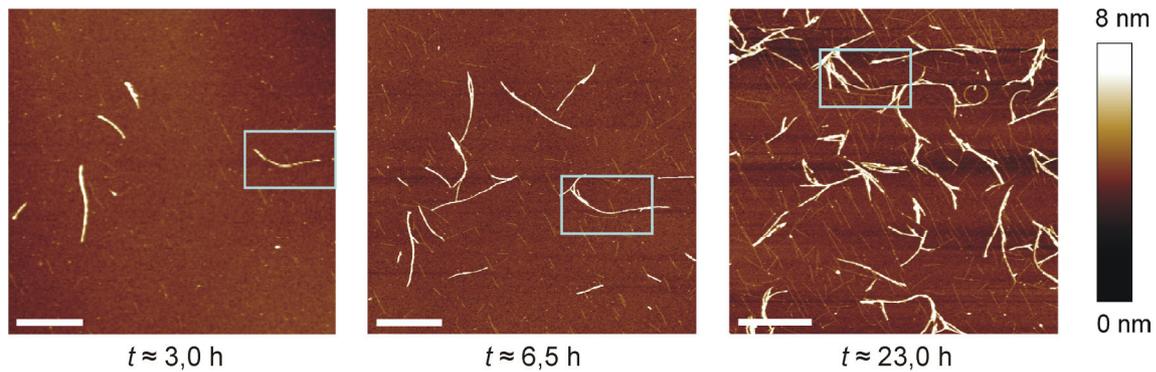


Abbildung 3.15: Zeitabhängige AFM-Aufnahmen der Aggregation von hIAPP + A β (je $c = 3 \mu\text{M}$) auf Glimmer. Es wurde derselbe Messbereich über die Zeit beobachtet und zur Verdeutlichung eine in allen Bildern vorhandene Fibrille mit einem hellblauen Rechteck markiert. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils $1 \mu\text{m}$. Nachdruck aus Ref. [140].

In **Abbildung 3.16A** und **B** sind repräsentative AFM-Aufnahmen und korrespondierende Höhenprofile des getrockneten hIAPP sowie der getrockneten hIAPP/A β -Mischung zu bestimmten Zeitpunkten der Aggregation ($t = 4 \text{ h}$ bzw. $t = 24 \text{ h}$) gezeigt. Im Fall des reinen hIAPP konnten bereits nach 4 h hauptsächlich Protofibrillen und gereifte Fibrillen detektiert werden, welches auf eine schnelle und zu diesem Zeitpunkt bereits annähernd abgeschlossene Aggregation des hIAPP hindeutet. Obwohl die Fibrillenbildung der hIAPP/A β -Mischung im Vergleich zum reinen hIAPP verzögert erfolgt, weisen frühe Protofibrillen in beiden Fällen ähnliche mittlere Höhen von $0,67 \pm 0,15 \text{ nm}$ für reines hIAPP bzw. $0,81 \pm 0,14 \text{ nm}$ für die Mischung auf. Darüber hinaus wurden auch ähnliche mittlere Höhen von $\sim 2,9 \text{ nm}$ für späte Protofibrillen und $\sim 5 \text{ nm}$ für gereifte Fibrillen in beiden Fällen detektiert. Somit konnten für beide amyloidogenen Systeme die verschiedenen Stadien der Aggregation unterschieden werden. Es konnten gereifte hIAPP-Fibrillen ($5,21 \pm 1,62 \text{ nm}$) des finalen Aggregationsstadiums bereits nach 4 h detektiert werden, wobei geringfügig dünnere hIAPP/A β -Heterofibrillen ($3,52 \pm 0,68 \text{ nm}$), die für eine frühere Aggregationsphase, wahrscheinlich die späte exponentielle Wachstumsphase, sprechen, erst nach einer Inkubation von 24 h gefunden wurden. Demnach zeigen sowohl hIAPP-Spezies als auch die hIAPP/A β -Heteroaggregate ähnliche Eigenschaften bezüglich ihrer Struktur, Verzweigung und Größe, obwohl die Kinetik ihrer Aggregation und Fibrillenbildung deutlich unterschiedlich verläuft (wie auch bereits in Experimenten mittels ATR-FTIR-Spektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie gezeigt).

Im Gegensatz zum reinen hIAPP und zur hIAPP/A β -Mischung konnten nur wenige Fibrillen einer mittleren Höhe von $\sim 3 \text{ nm}$ nach 72 h bei der Aggregation des reinen A β auf der Glimmeroberfläche detektiert werden (**Abb. 3.16**). Die Vorherrschaft von A β -Oligomeren und die nur geringen Mengen an Fibrillen sprechen für eine extrem langsame Aggregationskinetik des A β , in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ATR-FTIR-Spektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie.

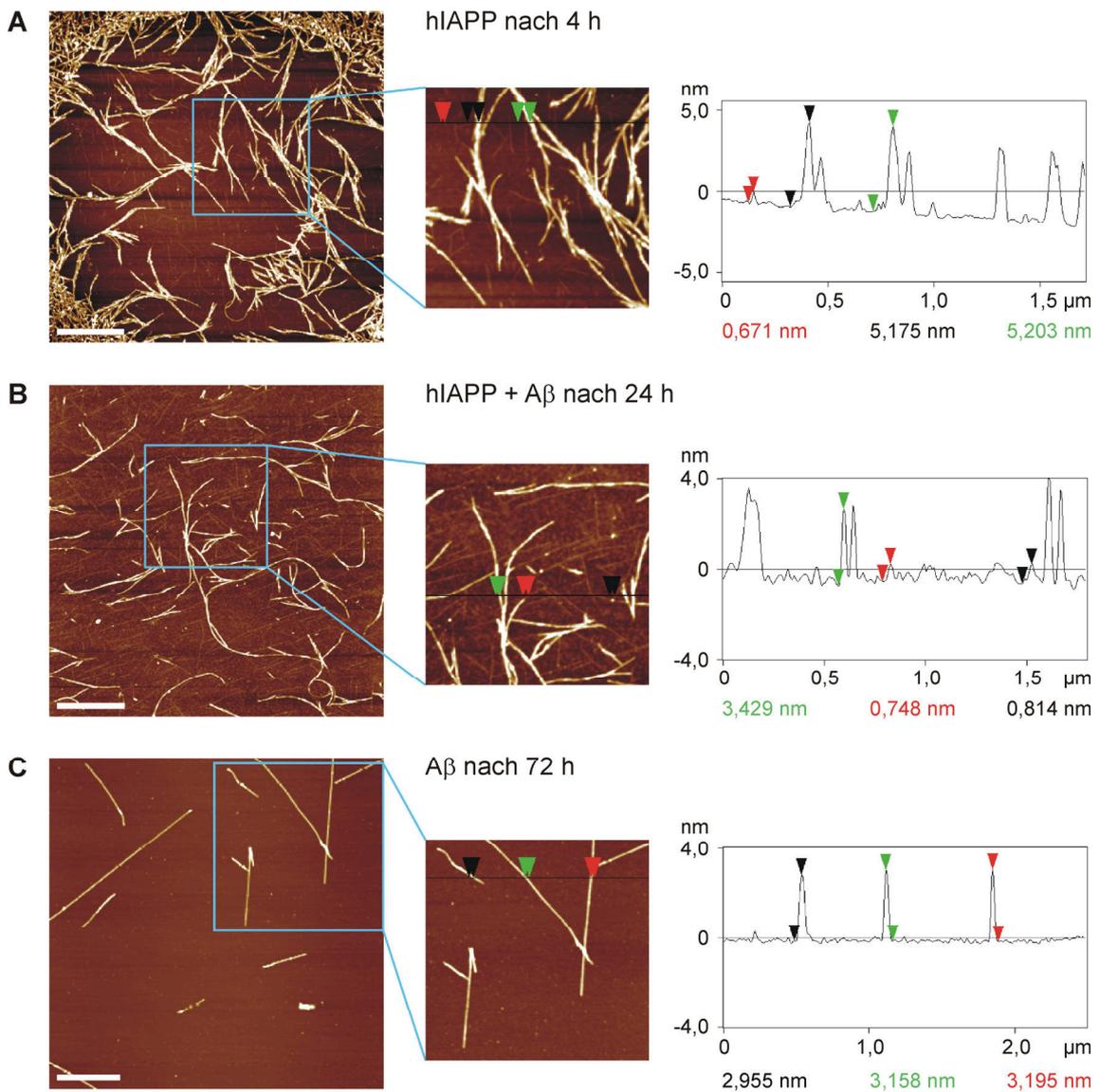


Abbildung 3.16: AFM-Aufnahmen der getrockneten Proben von $3\ \mu\text{M}$ hIAPP (A), $3\ \mu\text{M}$ hIAPP + $3\ \mu\text{M}$ A β (B) und $3\ \mu\text{M}$ A β (C) im Anschluss an deren Aggregation für 4 h, 24 h bzw. 72 h bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer auf Glimmer. Auf der linken Seite sind jeweils der gesamte Aufnahmebereich sowie eine entsprechende Vergrößerung gezeigt. Rechts dargestellt ist jeweils ein Höhenprofil, bei dem die vertikale Distanz zwischen Pfeilpaaren analysiert wird. Die schwarze Linie im vergrößerten Bild zeigt die Lokalisation des Höhenprofils. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils $1\ \mu\text{m}$. Nachdruck aus Ref. [140].

3.2.5 Zusammenfassung und Diskussion

Um einen Einblick in die molekularen Grundlagen der Hetero- und Selbstassoziation von hIAPP und A β , die mit den Peptidaggregationskrankheiten Diabetes mellitus und Alzheimer sowie deren möglichen Verknüpfung assoziiert sind, zu erhalten, wurde deren gemeinsames Aggregationsverhalten im Vergleich zum Verhalten der beiden einzelnen Peptide untersucht. Die Analyse der Aggregation der einzelnen amyloidogenen Peptide – hIAPP und A β – an der isolierten β -Zellmembran zeigt eine rapide Adsorption und Konformationsumwandlung zur fibrillären Struktur für hIAPP (vgl. Kapitel 3.1.5). Im Gegensatz dazu konnte nur eine geringe Adsorption des A β an

die β -Zellmembran, sowohl in ATR-FTIR-spektroskopischen als auch in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten, detektiert werden. Auch bei korrespondierenden AFM-Messungen erfolgte eine sofortige Adsorption und Fibrillenbildung des hIAPP auf der negativ geladenen Glimmeroberfläche, wobei gereifte Fibrillen bereits nach 4 h detektiert werden konnten. Die Aggregation des A β fand hingegen auch an dieser Oberfläche extrem langsam statt. Ein Grund könnte in der negativen Nettoladung des A β bei neutralem pH liegen, die das Peptid von der 2,5 mol% negativ geladenen β -Zellmembran und der Glimmeroberfläche abstößt. Andererseits wurde in früheren Studien auch nur eine geringe Interaktion des A β mit zwitterionischen Lipiddoppelschichten beschrieben [161,163]. Dennoch kommt es mit der Zeit zur Interaktion zwischen A β und der isolierten Membran, da ATR-FTIR-Spektren β -faltblattreicher A β -Strukturen nach 20 h aufgenommen werden konnten und die Permeabilisierung der GUV erfolgte. Diese verzögerte Adsorption könnte durch eine konformationelle Änderung in der Sekundärstruktur des amphiphilen A β (z. B. zu β -faltblattreichen Oligomeren oder Protofibrillen) ausgelöst worden sein, sodass eine an positiv geladenen Aminosäuren reiche Peptidomäne oder der hydrophobe C-Terminus des A β in der Lage ist, mit der negativ geladenen Membranoberfläche zu interagieren. Diese Vermutung steht in Einklang mit neuesten Studien, die besagen, dass die A β -Membran-Interaktion sowohl durch elektrostatische als auch hydrophobe Wechselwirkungen getrieben ist [163,165,166].

Zur Bestimmung der Kreuz-Interaktion von hIAPP und A β in Anwesenheit der isolierten β -Zellmembran erfolgten identische Studien wie mit den Einzelpeptiden, auch mit einer äquimolaren Mischung aus hIAPP und A β . Die Ergebnisse wiesen dabei auf eine wesentliche Retardation, sowohl der Adsorption an die geringfügig negativ geladene Membran und die Glimmeroberfläche als auch der Peptidaggregation und der Permeabilisierung der isolierten β -Zellmembran, im Vergleich zum Verhalten des reinen hIAPP, hin. Hieraus lässt sich auf eine Heterokomplexbildung von hIAPP und A β schließen, die vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und elektrostatische Interaktionen zwischen basischen Aminosäureseitenketten des hIAPP und sauren Aminosäuren des A β initiiert wird. Ein direkter Nachweis der Bildung von hIAPP/A β -Heterokomplexen in Lösung in der Abwesenheit von Membranen wurde bereits durch *Pull-Down*-Assays in früheren Studien erzielt [164]. Basierend auf der aktuellen Identifikation der IAPP/A β -Interaktionsbereiche wurde als Basis für die Analyse der Ergebnisse dieser Studie ein 1:1-Bindungsmodell von hIAPP und A β angenommen [154]. Eine signifikante Interaktion des Heterokomplexes mit der isolierten β -Zellmembran konnte trotz verlangsamter Adsorption an die Lipidmembran detektiert werden, da mit der Zeit die Akkumulation beider amyloidogener Peptide an der Membranoberfläche und im Anschluss deren Permeabilisierung beobachtet wurde. Weiterhin wiesen die hIAPP/A β -Heterokomplexe ein hIAPP-ähnliches Aggregations-

verhalten, d. h. eine konformationelle Umwandlung von einer ungeordneten, partiell α -helikalen Struktur hin zur fibrillären β -Faltblatt-Konformation auf. Dieses wurde durch die Beobachtung von Oligomeren, Protofibrillen und gereiften Fibrillen mit hIAPP-ähnlichen Charakteristika, wie Struktur, Verzweigung und Größe, in AFM-Experimenten bestätigt. Daraus könnte abgeleitet werden, dass sich hIAPP/A β -Heterokomplexe zunächst in Lösung bilden und anschließend aufgrund elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen an die β -Zellmembran adsorbieren, wo die weitere Aggregation und Fibrillenbildung unter Permeabilisierung der Membran stattfindet. Diese Ergebnisse könnten auch die in Zellviabilitätsstudien gefundene verlangsamte zytotoxische Wirkung der hIAPP/A β -Heteroaggregate erklären [164].

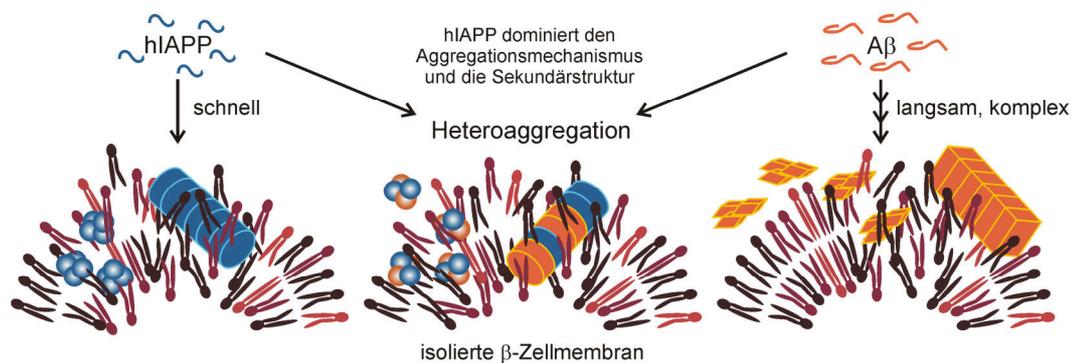


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des vermuteten Mechanismus der Kreuz-Interaktion und Heteroaggregatbildung von hIAPP und A β .

Im Vergleich zur Studie der Kreuz-Interaktion von hIAPP und A β an einer anionischen *raft*-Modellmembran konnten keine signifikanten Unterschiede in der Heterokomplexbildung an der isolierten β -Zellmembran festgestellt werden [138]. Wie in Abbildung 3.17 schematisch dargestellt, wurde auch an der β -Zellmembran ein signifikanter Unterschied der Interaktion des hIAPP/A β -Heterokomplexes im Vergleich zu der Wechselwirkung beider einzelnen Peptide in ihrer membranassoziierten Aggregation gefunden. Der gebildete hIAPP/A β -Heterokomplex adsorbiert, aggregiert und permeabilisiert die β -Zellmembran deutlich langsamer als hIAPP allein, aber signifikant schneller als reines A β . Bei der Kreuz-Interaktion und Heterokomplexbildung der beiden stark amyloidogenen Peptide könnte es sich demnach durchaus um den molekularen Zusammenhang der beiden assoziierten Erkrankungen Typ II Diabetes mellitus und Alzheimer handeln.

Ein weiterer interessanter Aspekt bezüglich der Aufklärung der molekularen Grundlage der hIAPP/A β -Heteroaggregation wäre die Untersuchung der genauen Zusammensetzung und Struktur der gebildeten Heteroaggregate auf molekularer Ebene. Dabei könnten mögliche Angriffspunkte von Therapeutika, die sowohl die Kreuz-Interaktion und Heteroaggregatbildung als auch die Selbstassoziation der reinen Peptide verhindern könnten, identifiziert werden. Aufgrund der Polydispersität der amyloiden Spezies zu

allen Zeitpunkten der Aggregation sowie der zeitlichen Instabilität der intermediären amyloidogenen Strukturen, wie Oligomere oder frühe Protofibrillen, und der Größe und schlechten Löslichkeit der fibrillären Spezies ist eine hochauflösende Strukturaufklärung der Heteroaggregate zur Zeit noch schwer zu erreichen. Selbst für die Aggregate reiner amyloidogener Peptide und Proteine sind aktuell nur wenige hochaufgelöste Strukturen und diese ausschließlich von amyloiden Fibrillen bekannt. Um eine solche Strukturaufklärung zu erreichen, ist in jedem Fall die Anwendung mehrerer physikalisch-chemischer Methoden notwendig. Dieses wurde am Beispiel der Strukturaufklärung eines aus elf Aminosäuren bestehenden Fragments des Transthyretins unter Einsatz von MAS-NMR-(*magic angle spinning-nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie, cryo-EM (cryo-Elektronenmikroskopie), Röntgenbeugung, TEM (Transmissions-EM) und AFM gezeigt [18].

3.3 Serum Amyloid P als Chaperon der hIAPP Faltung?

3.3.1 Hintergrund, Motivation und Zielsetzung

Bei nahezu allen Proteinablagerungserkrankungen enthalten die in den betroffenen Patienten detektierten extrazellulären Aggregate neben den amyloiden Fibrillen der krankheitsspezifischen Peptide oder Proteine noch weitere, sogenannte sekundäre Amyloid-Komponenten [167,168]. Unabhängig von der Art des fibrillenbildenden Peptids oder Proteins und der entsprechenden Erkrankung tritt dabei immer wieder die gleiche Gruppe an sekundären Komponenten in diesen Ablagerungen auf. So werden häufig Glykosaminoglykane (wie z. B. Heparin, Heparansulfat oder Chondroitinsulfat), Proteoglykane (z. B. Perlecan), Plasmaglykoproteine, wie die Serum Amyloid P Komponente (SAP), Apolipoprotein E und Kollagen, aber auch Metallionen, die alle sehr stark aber nicht kovalent an die Aggregate gebunden sind, identifiziert [14,167–169]. Die Rolle dieser selbst nicht amyloidogenen sekundären Amyloid-Komponenten bezüglich ihres Einflusses auf die Aggregation und die Pathogenität der gebildeten Spezies *in vivo* ist im Einzelnen noch nicht aufgeklärt. Für verschiedene Glykosaminoglykane, u.a. für Heparin, konnte allerdings bereits eine beschleunigende Wirkung auf die Aggregation und Fibrillenbildung einiger amyloidogener Peptide, wie hIAPP, A β , α -Synuclein und ein Fragment des Prion-Proteins, *in vitro* nachgewiesen werden [170–174]. Auch das Proteoglykan Perlecan, ein mit mehreren Glykosaminoglykanketten ausgestattetes Protein, ist in der Lage, beispielsweise die Aggregation des hIAPP zu beschleunigen [172]. Der gegenteilige Effekt, d. h. die Inhibition der Proteinaggregation und des dadurch ausgelösten Zelltods, wurde für das Plasmaprotein SAP gegenüber dem amyloidogenen Protein Transthyretin detektiert [175]. Auch im

Zusammenhang mit A β wurde durch SAP eine Verlangsamung bis hin zur Inhibition der Peptidaggregation erreicht [176]. Eine mögliche Begründung dieser Effekte könnte in der beobachteten Chaperonaktivität des SAP liegen, die durch die teilweise Rückfaltung einer denaturierten Laktatdehydrogenase in ihre aktive Konformation dargestellt wurde [177]. Dementgegen steht eine stabilisierende Wirkung des SAP auf bereits gebildete Fibrillen des A β , da SAP in der Lage ist, die proteolytische Degradation dieser Fibrillen durch verschiedene Proteasen zu inhibieren [178].

Die Serum Amyloid P Komponente selbst ist ein Mitglied der Pentraxin Proteinfamilie, deren Struktur durch fünf identische nicht-kovalent verknüpfte Untereinheiten, die eine scheibenähnliche Struktur bilden, charakterisiert ist. Das SAP-Pentamer besteht dabei aus fünf Untereinheiten von je 25 kDa, die einen hohen Anteil an antiparallelen β -Strängen in zwei übereinander angeordneten und durch eine Disulfidbrücke verknüpften β -Faltblättern (*jelly roll β -barrel*) enthalten (Abb. 3.18). Außerdem ist auf dieser β -Faltblattstruktur jeweils eine α -Helix lokalisiert [179]. Als posttranslationale Modifikation verfügt jede SAP-Untereinheit weiterhin über ein *N*-verknüpftes Oligosaccharid, welches mehr als 8% der Gesamtmasse des Moleküls ausmacht [169].

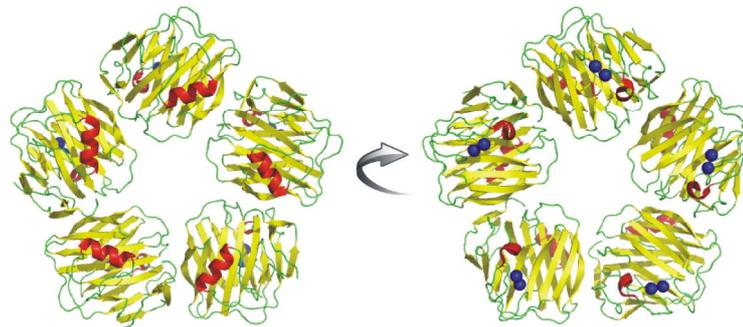


Abbildung 3.18: Vorder- und rückseitige Ansicht der pentameren Struktur der Serum Amyloid P Komponente. Die antiparallel angeordneten und eine *jelly roll* β -Fasstruktur ausbildenden β -Faltblätter sind in Gelb dargestellt, α -Helices in Rot, Schleifen in Grün und die beiden gebundenen Ca^{2+} -Ionen in Blau. Modifiziert aus PDB Eintrag 1sac.

SAP wird in der Leber synthetisiert und abgebaut und tritt in einer Konzentration von $\sim 30\text{-}40\ \mu\text{g/mL}$ im humanen Blutserum [180] bzw. von im Mittel $\sim 8,5\ \text{ng/mL}$ in der Zerebrospinalflüssigkeit [181] auf. Dabei wird kontrovers diskutiert, ob SAP im Serum in Form des beschriebenen Pentamers oder als Dekamer, das sich aus zwei kopfseitig nicht-kovalent verknüpften Pentameren zusammensetzt, zirkuliert [179,182,183]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die strukturelle Form vom pH-Wert, der Konzentration an Ca^{2+} -Ionen und den vorhandenen Liganden abhängig ist [183]. Jede Untereinheit des Proteins enthält zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen [179] und zeigt eine spezifische Ca^{2+} -abhängige Bindung an diverse Liganden, u. a. an bestimmte Oligosaccharide, an Glykosaminoglykane [184] oder an die Phosphoethanolamingruppe [179]. Durch die Bindung dieser Liganden lokalisiert SAP u. a. an die Basalmembran,

Arteriolen, Bronchiolen und das Sarkolemm der glatten Muskulatur [185]. Möglicherweise ist diese Ligandenbindung auch für die Lokalisation des SAP an viele Formen der amyloiden Fibrillen verantwortlich [169,179,186].

Zur Interaktion und Wirkung des SAP auf die Aggregation, Stabilität und Cytotoxizität des hIAPP sind noch keine Studien bekannt. Aufgrund des Auffindens dieses Plasma-proteins in allen krankheitsbedingten amyloidogenen Ablagerungen sowie der hohen Sequenzanalogie des hIAPP zum A β (vgl. Kapitel 3.2.1), für welches bereits eine Interaktion mit SAP nachgewiesen wurde, ist es von großem Interesse, auch die Wechselwirkung zwischen hIAPP und SAP zu studieren. Möglicherweise kann auch gegenüber dem hIAPP eine aggregationsinhibierende oder fibrillenstabilisierende Wirkung des SAP beobachtet werden. Somit könnten wertvolle Hinweise auf Faktoren, die das Aggregationsverhalten oder die Stabilität des hIAPP *in vivo* beeinflussen, erlangt werden, welche für die Entwicklung von Therapeutika von großer Bedeutung sein könnten.

3.3.2 Aggregationskinetik des hIAPP unter SAP-Einfluss

Im Folgenden sind erste Ergebnisse der Untersuchungen zur Wechselwirkung von hIAPP und SAP dargestellt. Die praktische Durchführung dieser Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Susanne Dogan und Mimi Gao (Bachelorstudentin bzw. Forschungspraktikantin am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I).

Um zunächst den konzentrationsabhängigen Effekt des SAP auf die Aggregationskinetik des hIAPP zu untersuchen, wurden wie zuvor beschrieben fluoreszenzspektroskopische ThT-Assays durchgeführt (Abb. 3.19). Als Kontrollexperimente wurden die zeitabhängigen Änderungen der Fluoreszenzintensität des ThT in einer reinen hIAPP-Lösung sowie einer reinen SAP-Lösung jeweils in einer Konzentration von $c = 10 \mu\text{M}$ in Puffer (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 10 μM ThT, pH 7,4) untersucht. Reines hIAPP zeigte bei dieser Messung den typischen Aggregationsverlauf mit einer lag-Phase von $\sim 1,2 \text{ h}$, gefolgt von einer exponentiellen Zunahme der Fluoreszenzintensität des ThT bei 482 nm ($k_{\text{app}} \approx 4,2 \text{ h}^{-1}$), welche auf eine rapide Elongation der amyloiden Fibrillen des hIAPP hindeutet. Die stationären Phase wurde nach etwa 4 h Inkubation erreicht. Im Gegensatz dazu zeigt das ThT-Assay der reinen SAP-Lösung keinerlei Erhöhung der Fluoreszenzintensität und somit keine unspezifische Bindung des ThT durch SAP und, wie erwartet, keine amyloidogene Aggregation des reinen SAP. Bei der gemeinsamen Inkubation einer Mischung aus hIAPP und SAP in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen konnte sowohl eine von der SAP-Konzentration abhängige Verlängerung der lag-Phasen der hIAPP-Aggregation, als auch eine Verlangsamung der Elongationsphasen im Vergleich zur

Aggregation des reinen hIAPP, ermittelt werden. Darüber hinaus wurde eine verminderte Fluoreszenzintensität der stationären Phase im Fall der Aggregation des hIAPP mit SAP im Verhältnis 1:2 detektiert. Aus diesen Ergebnissen kann eine generelle Interaktion von hIAPP und SAP unter den vorliegenden Bedingungen gefolgert werden. Weiterhin scheint die Nukleation und Fibrillenbildung des hIAPP durch SAP retardiert und im Fall eines Überschusses an SAP teilweise inhibiert zu werden. In letztem Fall ist eine geringere Menge an Fibrillen in der stationären Phase vorhanden, welches sich aus der verringerten Fluoreszenzintensität, die proportional zur Fibrillenmenge ist, schließen lässt. Da die beobachteten Aggregationskurven der hIAPP/SAP-Mischungen nicht mehr dem typischen sigmoidalen Kurvenverlauf der Fluoreszenzzunahme folgen, kann eine quantitative Auswertung dieser Kurven, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, nicht erfolgen. Dies lässt zusätzlich den Rückschluss zu, dass die Aggregation des hIAPP in Anwesenheit von SAP nicht mehr vollständig dem Modell der nukleationsinduzierten Polymerisation entspricht. Ein solches Verhalten könnte mit der bereits gegenüber der Laktatdehydrogenase beschriebenen Chaperonaktivität des SAP erklärt werden. Möglicherweise ist SAP in der Lage, frühe oligomere Spezies der hIAPP-Aggregation zu binden, zu stabilisieren oder sogar in ihre native Form zurückzufalten. Dies würde sowohl die verlängerte Nukleations-Phase als auch die verlangsamte Elongation der hIAPP-Fibrillen erklären.

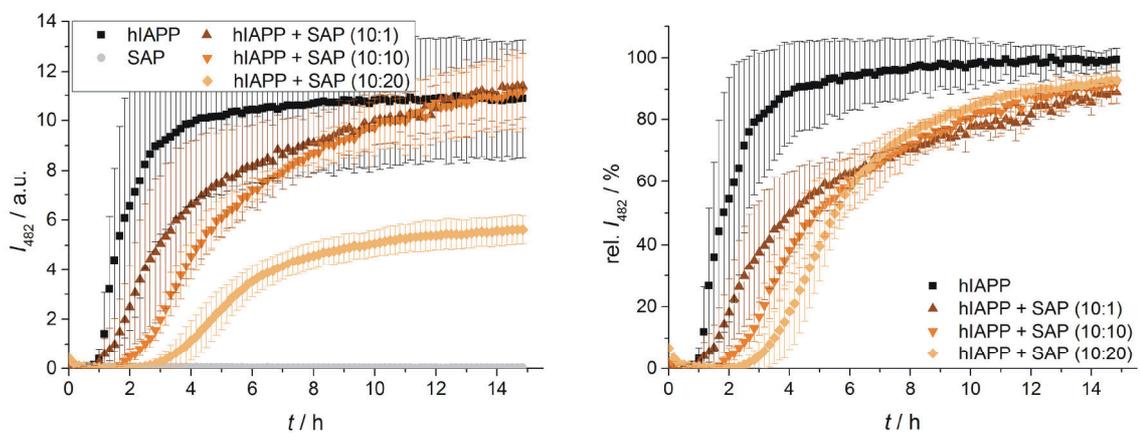


Abbildung 3.19: Aggregationskinetiken des hIAPP in Anwesenheit steigender Konzentrationen des SAP. Absolute (links) und relative (rechts) Werte der Fluoreszenzintensität des ThT während der zeitabhängigen Aggregation des reinen hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$, schwarz), des reinen SAP ($c = 10 \mu\text{M}$, grau) sowie des hIAPP zusammen mit SAP im Verhältnis $10 \mu\text{M} : 1 \mu\text{M}$ (braun), $10 \mu\text{M} : 10 \mu\text{M}$ (orange) und $10 \mu\text{M} : 20 \mu\text{M}$ (gelb).

Um diese Hypothese zu untermauern und den Einfluss des SAP auf die unterschiedlichen Aggregationsphasen des hIAPP zu untersuchen, wurden weitere fluoreszenzspektroskopische ThT-Assays unter zeitlich versetzter Zugabe des SAP durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.20 gezeigt. Es wurde jeweils eine äquimolare Konzentration von hIAPP und SAP ($c = 10 \mu\text{M}$) verwendet, wobei die Zugabe des SAP entweder im Verlauf der Nukleationsphase bei

$t = 1$ h (Abb. 3.20A), während der Elongationsphase (B, $t = 1,5$ h) oder nach 3 h der Inkubation zu Beginn der stationären Phase (C) erfolgte.

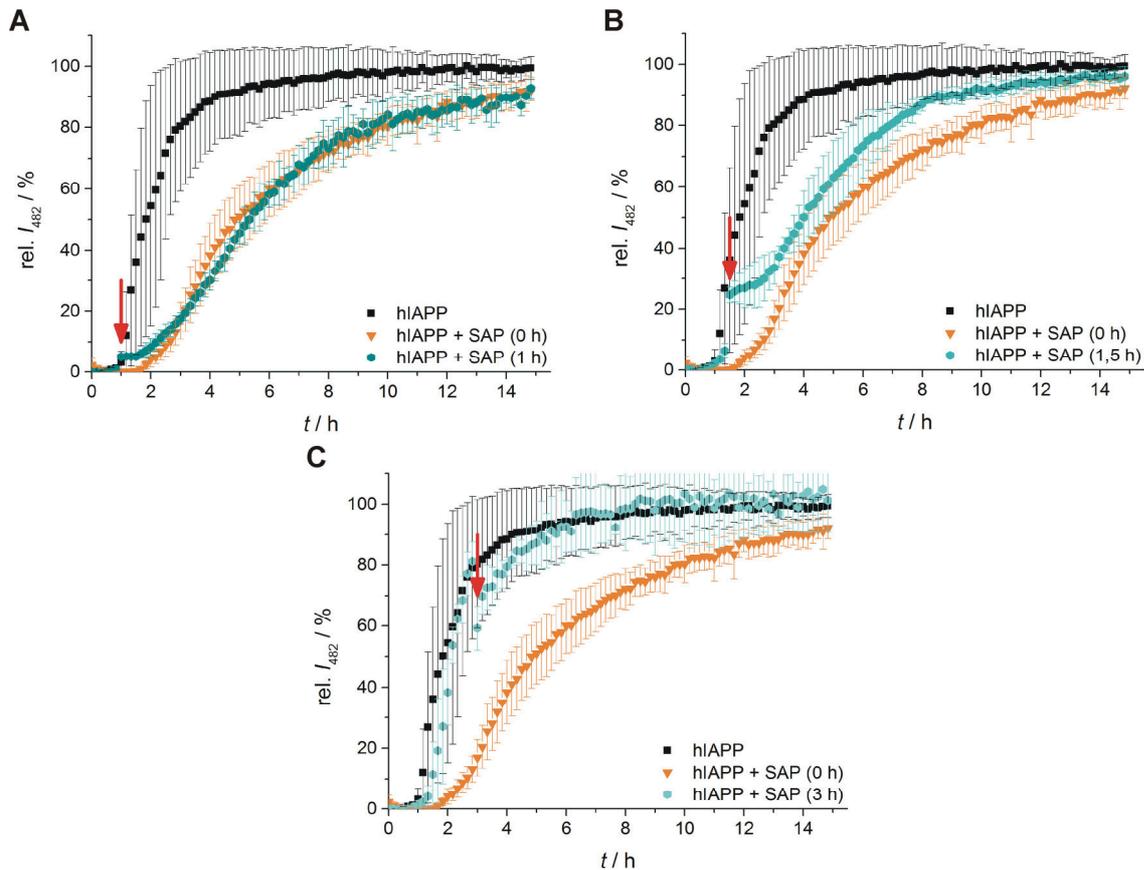


Abbildung 3.20: Aggregationskinetiken des hIAPP bei Zugabe einer äquimolaren Konzentration an SAP zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aggregation. Relative zeitabhängige Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation des reinen hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$, schwarz) und bei Zugabe von SAP ($c = 10 \mu\text{M}$) bei $t = 0, 1, 1,5$ und 3 h (roter Pfeil).

Bei Zugabe des SAP innerhalb der lag-Phase der Aggregation des hIAPP wurde zunächst eine geringe unmittelbare Erhöhung der Fluoreszenzintensität, die wahrscheinlich präparationsbedingt auf die Durchmischung der Probe zurückzuführen ist, und im Anschluss eine Verlängerung der lag-Phase und Retardation der Elongationsphase im Vergleich zur Aggregation des reinen hIAPP beobachtet. Im Vergleich zum Aggregationsverhalten der hIAPP/SAP-Mischung bei direkter Zugabe des SAP ($t = 0$ h) wurde trotz späterer Zugabe des SAP bei $t = 1$ h ein nahezu identischer Aggregationsverlauf erreicht. Erfolgte die SAP-Zugabe in der Elongationsphase, wurde wiederum ein sofortiger Fluoreszenzanstieg, in diesem Fall wahrscheinlich zurückzuführen auf die Durchmischung der Probe sowie den Fortschritt der Fibrillenbildung, gefolgt von einer erneuten lag-Phase unter Stagnation der Fibrillenelongation und anschließender verlangsamer Elongationsphase beobachtet. Auch in diesem Fall näherte sich der hIAPP-Aggregationsverlauf nach Zugabe des SAP bei $t = 1,5$ h dem Verlauf bei sofortiger SAP-Zugabe an, obwohl er nicht mehr vollständig erreicht wurde. Bei SAP-Zugabe nach 3 h der Inkubation des hIAPP, d. h.

zu Beginn der stationären Phase, wurde zwar eine kurzzeitige Abnahme der Fluoreszenzintensität, zurückzuführen auf die Durchmischung der Probe, aber keine weitere Veränderung des Aggregationsverlaufs im Vergleich zu dem des reinen hIAPP detektiert. Auch diese Ergebnisse legen nahe, dass SAP einen Einfluss auf oligomere hIAPP-Spezies ausübt und möglicherweise deren konformationelle Stabilisierung oder Rückfaltung in ihre nativ ungeordnete Konformation bewirkt.

3.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die im vorherigen Abschnitt präsentierten Ergebnisse stellen erst den Beginn einer Studie der Wechselwirkung zwischen hIAPP und SAP dar. Trotzdem können bereits erste Schlussfolgerungen aus diesen fluoreszenzspektroskopischen Ergebnissen gezogen werden. So konnte eine generelle Wechselwirkung zwischen hIAPP und SAP unter den vorliegenden Bedingungen nachgewiesen werden, da SAP die Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP konzentrationsabhängig retardiert bzw. im Überschuss partiell inhibiert. Darüber hinaus scheint SAP den Mechanismus der hIAPP-Aggregation, welcher typischerweise dem einer nukleationsinduzierten Polymerisation entspricht und damit einem sigmoidalen Kurvenverlauf im ThT-Assay folgt, durch die Verlängerung der Nukleationsphasen und vor allem durch die deutliche Retardation der Elongationsphasen zu verändern. Auch bei zeitversetzter SAP-Zugabe, innerhalb der Nukleations- sowie während der Elongationsphase, wurden verlängerte und erneute lag-Phasen unter Stagnation der Fibrillenelongation sowie retardierte Elongationsphasen detektiert. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse einen Einfluss des SAP auf oligomere Spezies des hIAPP nahe, da in beiden beeinflussten Aggregationsphasen – der Nukleations- sowie der Elongationsphase der hIAPP-Aggregation – hauptsächlich oligomere Spezies vorliegen. Somit könnte dieses Verhalten mit der für SAP beschriebenen Chaperonaktivität [177] erklärt werden, die möglicherweise zur Bindung, Stabilisierung und eventuell sogar zur Rückfaltung bestimmter oligomerer hIAPP-Spezies in ihre nativ ungeordnete Konformation führt. Durch diesen Effekt würden sowohl der Nukleationsprozess als auch die Fibrillenelongation verlangsamt ablaufen. Ähnliche Einflüsse, sichtbar in verlängerten lag- und Elongationsphasen, wurden auch bei der Aggregation des hIAPP in Anwesenheit von BSA (**B**ovines **S**erum**a**lbumin) detektiert (*vide infra* Kapitel 3.4.3), dem ebenfalls aktuell eine Chaperonaktivität nachgewiesen wurde [187]. Dies unterstützt die Hypothese der Chaperonaktivität des SAP auf intermediäre Spezies der Aggregation des hIAPP. Zur Bestätigung und Gewinnung eines gesamtheitlichen Einblicks in die molekularen Grundlagen der Interaktion von hIAPP und SAP müssen allerdings weitere Messungen unter Einbeziehung unterschiedlicher biophysikalischer Methoden durchgeführt werden.

Im Verlauf weiterer Studien der hIAPP/SAP-Interaktion wäre es wichtig, zunächst den Einfluss von Ca^{2+} -Ionen auf diese Wechselwirkung zu bestimmen. Alle im vorherigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden in Anwesenheit einer 2 mM Konzentration von CaCl_2 gewonnen, da in der Literatur bereits die Ca^{2+} -abhängige Bindung an amyloide Fibrillen beschrieben wurde [169,179,186]. Um diese Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung auch gegenüber hIAPP-Spezies zu bestätigen, müssten identische ThT-Studien in Abwesenheit von CaCl_2 durchgeführt werden. Aus diesen Ergebnissen könnte geschlossen werden, ob die Ca^{2+} -spezifische Bindung an Liganden, wie Oligosaccharide, Glykosaminoglykane [184] oder Phosphoethanolamingruppen [179], auch für die Bindung an hIAPP-Fibrillen verantwortlich sein könnte. Alle folgenden Untersuchungen könnten in Anlehnung an diese Ergebnisse in An- oder Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen durchgeführt werden.

Zur Gewinnung eines mechanistischen Einblicks in die hIAPP/SAP-Interaktion würde sich die ATR-FTIR-Spektroskopie, mittels derer die zeitabhängige Sekundärstrukturänderung der hIAPP/SAP-Mischung untersucht werden könnte, anbieten. Leider haben erste ATR-FTIR-spektroskopische Testexperimente der hIAPP/SAP-Mischung die vollständige Überlagerung der Amid-I'-Bande des hIAPP durch die des reinen SAP ergeben (vgl. Abb. A.3 im Anhang), sodass daraus keine Informationen zur Sekundärstrukturumwandlung der Mischung gewonnen werden konnten. Die Begründung für diese Überlagerung könnte möglicherweise in der deutlich stärkeren Adsorption des SAP im Vergleich zum hIAPP an das interne Reflexionselement der ATR-Messzelle, einen Si-Kristall, liegen.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der hIAPP/SAP-Interaktion könnten AFM-Messungen in Lösung mittels einer AFM-Flüssigzelle darstellen. Durch diese Untersuchungen könnte einerseits festgestellt werden, in wieweit SAP die Morphologie der hIAPP-Spezies während der Aggregation beeinflusst. Andererseits könnte durch Zugabe des SAP zu unterschiedlichen Zeitpunkten der hIAPP-Aggregation, analog zur Vorgehensweise bei den ThT-Studien im vorigen Abschnitt, möglicherweise bestimmt werden, mit welcher Art von hIAPP-Spezies – Monomere, Oligomere, Protofibrillen oder gereifte Fibrillen – SAP interagiert und in welcher Weise es die Morphologie dieser Spezies verändert. Auch im Verlauf dieser Studien könnte der Einfluss von Ca^{2+} -Ionen auf die Bindung von SAP an Fibrillen oder andere amyloidogene Spezies untersucht werden.

Abschließend sollte auch die beschriebene Stabilisierung von amyloidogenen Fibrillen durch SAP gegenüber proteolytischem Abbau [178] in Bezug auf die Wechselwirkung von hIAPP und SAP untersucht werden. Dazu könnte der proteolytische Abbau von verschiedenen hIAPP-Spezies – Monomere, Oligomere und Fibrillen – allein bzw. nach

Inkubation mit SAP über die elektrophoretische Methode der Tricine-SDS-PAGE (*Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), die in der Lage ist, auch sehr kleine Peptidfragmente bis zur Größenordnung von ~1 kDa aufzutrennen, detektiert werden. Somit könnten Unterschiede im proteolytischen Abbau des hIAPP in An- und Abwesenheit von SAP aufgeklärt und daraus Rückschlüsse auf eine mögliche Stabilisierung von hIAPP-Fibrillen durch SAP gezogen werden. Falls eine Stabilisierung der Fibrillen vorliegen würde, könnte dies auf eine Maskierung der hIAPP-Fibrillen vor proteolytischem Abbau *in vivo* und damit auf eine mögliche Ursache der amyloiden Ablagerungen bei Typ II Diabetes mellitus hindeuten.

3.4 Verhalten des hIAPP im Crowding*

3.4.1 Hintergrund, Motivation und Zielsetzung

Die bisher in dieser Arbeit dargestellten Studien, wie auch die meisten der in der Literatur beschriebenen Arbeiten zur Proteinaggregation, wurden *in vitro* in verdünnten Lösungen durchgeführt. Diese Lösungsumgebung repräsentiert die Komplexität der nativen, zellulären Umgebung der untersuchten Peptide und Proteine allerdings nur unzureichend, welches ein deutlich unterschiedliches Verhalten der amyloidogenen Spezies in der verdünnten Lösung im Vergleich zur Situation *in vivo* zur Folge haben könnte. Aus diesem Grund haben Studien, die das Phänomen des sogenannten „makromolekularen Crowding“ (vom Englischen *crowd*, die Menge oder *crowded*, gefüllt, gedrängt) einbeziehen, im letzten Jahrzehnt auch bei der Untersuchung der Proteinaggregation an Aufmerksamkeit gewonnen. Crowding-Studien haben zum Ziel, die hohe Konzentration verschiedenster Makromoleküle im Inneren der biologischen Zelle, deren Volumen zu einem Anteil von etwa 20-30% mit Proteinen oder anderen Biopolymeren ausgefüllt ist (Abb. 3.21), zu simulieren [9,188]. Diese Crowding-Umgebung, die *in vitro* durch möglichst inerte Makromoleküle (sog. „Crowder“) geschaffen wird, führt zu dem Effekt des ausgeschlossenen Volumens [9,188]. Darüber hinaus wird das Verhalten von Biomolekülen in ihrem physiologischen Umfeld, wie auch in der Crowding-Umgebung *in vitro*, von weiteren Faktoren, wie einer erhöhten Viskosität der Lösung, reduzierten Diffusionskonstanten und unspezifischen Molekülinteraktionen, signifikant beeinflusst [189,190].

*Die Ergebnisse dieser Studie wurden in Referenz [198] veröffentlicht und werden in diesem Kapitel teilweise wiedergegeben.

[198] Reprinted from Seeliger, J., Werkmüller, A., & Winter, R. (2013) Macromolecular Crowding as a Suppressor of Human IAPP Fibril Formation and Cytotoxicity, *PLoS ONE* 8, e69652.

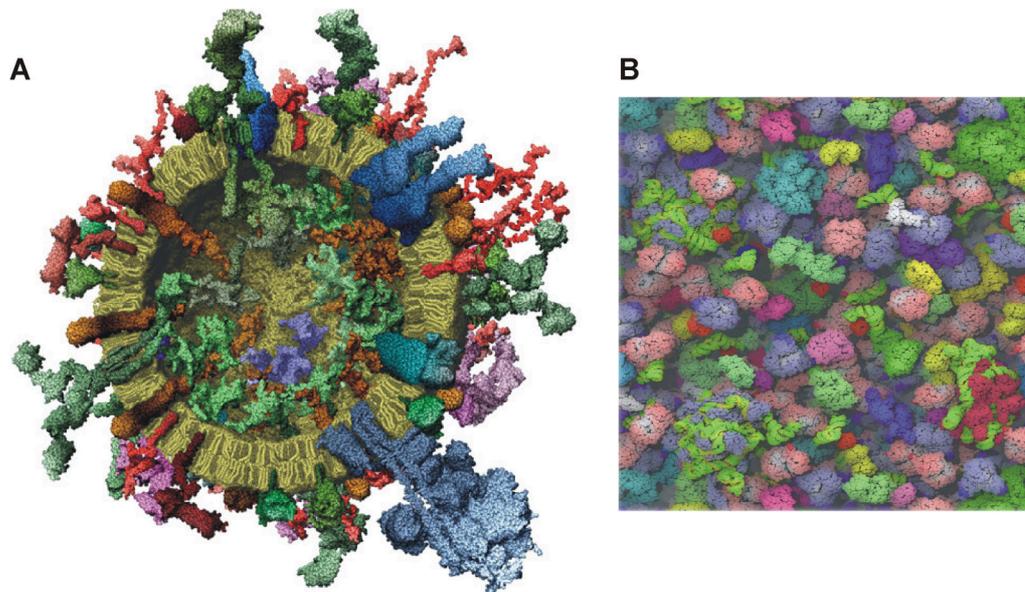


Abbildung 3.21: Molekulare Modelle des biologischen Crowdings. **A** Modell eines synaptischen Vesikels mit einer repräsentativen Zusammensetzung von Lipiden und Proteinen. Nachdruck aus Ref. [191]*. **B** Modell des bakteriellen Zytoplasmas von *Escherichia coli* auf Grundlage der 50 am häufigsten vorkommenden Makromoleküle. Nachdruck aus Ref. [189]†.

Für *in vitro* Studien werden typischerweise zwei verschiedene Arten von makromolekularen Crowdern gewählt. Dies sind einerseits Polymere bzw. Polysaccharide, wie Polyethylenglycol, Ficoll oder Dextran und andererseits globuläre Proteine, wie Bovines Serumalbumin (BSA) oder Lysozym. Die beiden polymeren Crowder Ficoll und Dextran werden als relativ inert und gut wasserlöslich, mit einem mittleren Molekulargewicht von ~ 70 kDa charakterisiert und bilden bei hohen Konzentrationen in Lösung netzwerkartige Strukturen unterschiedlicher Viskosität aus (Abb. 3.22A). Sie unterscheiden sich in ihrem molekularen Aufbau; Dextran besteht aus stark verzweigten Glukosemolekülen, wohingegen Ficoll ein verzweigtes Kopolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin darstellt [192–194]. Im Gegensatz dazu können die globulären Proteine BSA und Lysozym im Wesentlichen als Systeme harter Kugeln mit unterschiedlichen hydrodynamischen Radien von $r_{\text{BSA}} \approx 3,1$ nm und $r_{\text{Lys}} \approx 1,7$ nm (Abb. 3.22B und C) beschrieben werden, die neben dem Effekt des ausgeschlossenen Volumens auch zur Untersuchung von Einflüssen unspezifischer Wechselwirkungen herangezogen werden können [195–197]. Werden dementsprechend verschiedene Arten von Crowdern für *in vitro* Studien gewählt, so können die Auslöser des Crowdings in der biologischen Zelle – zelluläre Netzwerkstrukturen (wie z. B. das Aktin-Netzwerk) und die dicht gepackte Proteinumgebung – sinnvoll simuliert werden.

*Reprinted from Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., & Jahn, R. (2006) Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle, *Cell* **127**, 831–846, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

†Reprinted from McGuffee, S. R., & Elcock, A. H. (2010) Diffusion, crowding & protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm, *PLoS Comput Biol* **6**, e1000694.

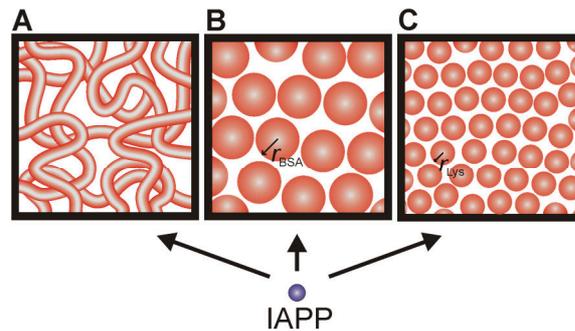


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der molekularen Charakteristika verschiedener Crowdersysteme. **A** Hohe Konzentrationen an Ficoll und Dextran weisen eine netzwerkartige Struktur auf. **B, C** Die Proteine BSA und Lysozym können als Systeme harter Kugeln, mit einem größeren hydrodynamischen Radius von BSA (**B**) gegenüber Lysozym (**C**) und dementsprechenden Unterschieden in den Dimensionen des freien Volumens, beschrieben werden. Nachdruck aus Ref. [198].

Das Verständnis des Einflusses molekularen Crowdings auf die Fehlfaltung, Selbstassoziation und Fibrillenbildung von amyloidogenen Peptiden und Proteinen ist von großer Bedeutung, da die natürliche Umgebung all dieser Prozesse die mit biologischen Makromolekülen gefüllte Zelle darstellt. Somit ist es auch von fundamentalem Interesse für die biomedizinische Forschung, die Unterschiede der Verhaltensweisen von amyloidogenen Peptiden und Proteinen *in vivo* und *in vitro* aufzuklären. Für verschiedene dieser amyloidogenen Peptide und Proteine konnten bereits Einblicke in das Verhalten unter Crowding-Bedingungen gewonnen werden [199–204]. Die Ergebnisse sind dabei protein- bzw. peptidspezifisch unterschiedlich und zeigen in einigen Fällen eine Beschleunigung der Aggregation und Fibrillenbildung, wie z. B. für α -Synuclein und Apolipoprotein C-II [199–202]. Anderenfalls konnte, z. B. im Fall von Insulin, eine retardierende oder inhibierende Wirkung nachgewiesen werden [201,203]. Als Begründung für diese unterschiedlichen Verhaltensweisen wurde die monomere Konformation des jeweiligen Proteins oder Peptids angeführt. Demnach wird der Aggregationsprozess von nativ ungeordneten Proteinen/Peptiden in der Crowding-Umgebung, aufgrund der Formation und Stabilisierung von partiell gefalteten und damit aggregationsanfälligen Intermediaten, beschleunigt. Im Gegensatz dazu wird die Fibrillenbildung von Peptiden und Proteinen, die in ihrer monomeren Form eine spezifische Sekundärstruktur aufweisen, verlangsamt oder vollständig inhibiert, da in diesem Fall die vorhandene Konformation stabilisiert wird [201].

Um das Aggregationsverhalten des hIAPP in diesem Zusammenhang zu studieren, welches nativ in einer ungeordneten Konformation unter transienter Ausbildung von unterschiedlichen Sekundärstrukturmotiven vorliegt [24,25], wurden vier verschiedene Crowder, d. h. zwei Polymere und zwei globuläre Proteine, zur Simulation unterschiedlicher Komponenten der zellulären Umgebung eingesetzt. Mit Hilfe dieser Studie können möglicherweise auch die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Einflüsse von zellulären Lipiden und physiologisch relevanten Interaktionspartnern auf

das Aggregationsverhalten des hIAPP im zellulären Kontext besser beurteilt und verstanden werden.

3.4.2 Einschränkung der Diffusion des IAPP durch Crowder

Zur Charakterisierung der Art und Weise, in der die Mobilität des monomeren hIAPP in den unterschiedlichen Lösungen der Crowder eingeschränkt wird und zur Beobachtung einer möglichen Bindung des hIAPP an die Crowder-Moleküle wurden die Diffusions-eigenschaften des rIAPP bestimmt. Im Speziellen wurde die laterale Diffusionskonstante, D , des C-terminal mit BODIPY FL-markierten Ratten-IAPP (rIAPP-K-BODIPY FL) als Funktion der Crowder-Konzentration mittels Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS, *fluorescence correlation spectroscopy*) bestimmt (Abb. 3.23A und Tab. A.1 im Anhang). Die experimentelle Durchführung und Auswertung dieser FCS-Messungen erfolgte durch Alexander Werkmüller (Doktorand am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I), Details dazu sind in der Referenz [198] zu finden. Im Rahmen dieser Messungen wurde rIAPP als nicht-amyloidogenes IAPP-Analogon (vgl. Kapitel 1.3.3) anstelle des hIAPP verwendet, da es in seiner monomeren Konformation verbleibt und nicht zur Aggregation in der Lage ist [205,206]. Somit können Änderungen der gemessenen Diffusionskonstanten allein auf Unterschiede in den Crowding-Eigenschaften zurückgeführt werden und nicht auf die Aggregation des Peptids.

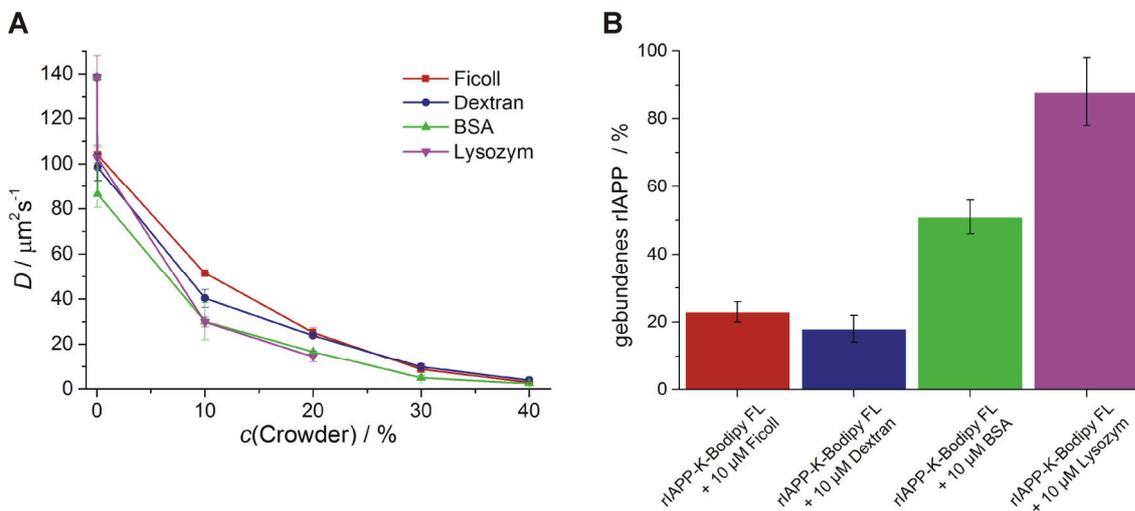


Abbildung 3.23: Einfluss der Art des Crowders auf die Diffusion und Bindung von rIAPP. **A** FCS-Messungen der Abhängigkeit der lateralen Diffusionskonstante, D , des rIAPP-K-BODIPY FL ($c = 10 \mu\text{M}$) von der Konzentration der Crowder Ficoll, Dextran, BSA und Lysozym (je $10 \mu\text{M}$ und 10-40% (w/v)). **B** Anteil des an die verschiedenen Crowder gebundenen rIAPP-K-BODIPY FL, berechnet aus den FCS-Messungen der äquimolaren Mischung von rIAPP und Crowder (je $c = 10 \mu\text{M}$). Nachdruck aus Ref. [198].

Schon in einer äquimolaren verdünnten Pufferlösung (10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4) des rIAPP-K-BODIPY FL mit jeweils einem der Crowder (je $c = 10 \mu\text{M}$) sinkt der Wert der

Diffusionskonstante des rIAPP signifikant, welches auf eine Bindung des rIAPP an die Crowder-Moleküle hindeutet (Abb. 3.23A). Über die Analyse dieser FCS-Daten mit Hilfe eines Zwei-Komponenten-Modells konnte der Anteil an rIAPP, der an die jeweiligen Crowder gebunden ist, bestimmt werden (Abb. 3.23B). Nur ein vergleichsweise geringer Anteil des rIAPP (~20%) bindet an die Polymer-Crowder Ficoll und Dextran. Im Gegensatz dazu sind nahezu 50% des rIAPP in einer Lösung mit BSA und mit Lysozym fast das gesamte rIAPP an die globulären Protein-Crowder gebunden. Daraus kann geschlossen werden, dass unspezifische Wechselwirkungen einen wesentlichen Einfluss auf die Einschränkung des rIAPP in Lösungen von Protein-Crowdern haben und nur eine geringe Auswirkung im Fall der Verwendung polymerer Crowder. Ähnliches gilt, aufgrund der hohen Sequenzanalogie von rIAPP und hIAPP, wahrscheinlich auch bezüglich der Einschränkung des hIAPP in den entsprechenden Crowder-Lösungen.

Wird die Konzentration der Crowder-Moleküle erhöht, sodass Crowding-Bedingungen erreicht werden ($c(\text{Crowder}) = 10\text{-}40\%$ (w/v)), kommt es zur weiteren konzentrationsabhängigen, im Wesentlichen exponentiellen Abnahme der Diffusionskonstanten im Fall aller verwendeten Crowder, allerdings mit geringen Unterschieden (Abb. 3.23A). Die Diffusionskonstante sinkt auf signifikant kleinere Werte bei geringer Crowder-Konzentration ($c(\text{Crowder}) = 10\%$ (w/v)) im Fall der globulären Proteine BSA und Lysozym ($D \approx 30 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) im Vergleich zu den Polymer-Crowdern Ficoll ($D = 51,4 \pm 0,2 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) und Dextran ($D = 40,3 \pm 4,0 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$). Dies deutet auf eine deutlich stärkere Einschränkung des rIAPP in der Lösung globulärer Proteine hin, welche auf die unspezifischen Wechselwirkungen des rIAPP mit diesen Crowdern, aber möglicherweise auch auf die engere und homogenere Größenverteilung des freien Volumens in diesen dichten Packungen harter Kugeln, zurückzuführen ist. Bei weiterer Erhöhung der Crowder-Konzentration nähern sich die Diffusionskonstanten des rIAPP in allen Crowder-Lösungen hingegen einem Wert von $D \approx 3 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ bei $c(\text{Crowder}) = 40\%$ (w/v) an. Diese Abnahme kann nicht mehr allein mit intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Crowdern und rIAPP erklärt werden, da eine vollständige Bindung des rIAPP bereits bei einer Crowder-Konzentration von 10% (w/v), die einem 150- bis 700-fachen molekularen Überschuss an Crowder gegenüber rIAPP entspricht, erreicht sein sollte. Die weitere Reduktion der Diffusionskonstanten ist wahrscheinlich auf die Vergrößerung des ausgeschlossenen Volumens und erhöhte Viskositäten zurückzuführen.

3.4.3 Crowder-Einfluss auf die Aggregation des hIAPP

Der Einfluss des makromolekularen Crowdings auf die Aggregation des hIAPP wurde über fluoreszenzspektroskopische ThT-Assays ermittelt. Zunächst wurde dabei die

Interaktion der Crowder mit hIAPP in verdünnter Pufferlösung (je $c = 10 \mu\text{M}$ in $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $10 \mu\text{M ThT}$, $\text{pH } 7,4$) bestimmt, um Effekte der Bindung des hIAPP an die Crowder auf den Aggregationsverlauf zu ermitteln (Abb. 3.24 und Tab. 3.3). Bei diesen Messungen wurde kein signifikanter Einfluss der polymeren Crowder Ficoll und Dextran auf die Aggregation des hIAPP festgestellt, welches mit der Beobachtung einer relativ geringen Bindung des rIAPP an die Crowder aus FCS-Messungen übereinstimmt. Im Gegensatz dazu zeigt BSA schon bei diesen geringen Konzentrationen eine deutliche Wirkung auf den Aggregationsverlauf des hIAPP mit einer Verdoppelung der Dauer der lag-Phase und Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der Fibrillen. Des Weiteren konnte für beide Proteine, d. h. BSA und Lysozym, eine signifikante Verringerung der maximalen Fluoreszenzintensität des ThT und damit der gebildeten Menge an Fibrillen detektiert werden. Diese Effekte lassen sich wahrscheinlich mit der durch FCS ermittelten Bindung des rIAPP an die Crowder, welche auch bei hIAPP vorzuliegen scheint, erklären.

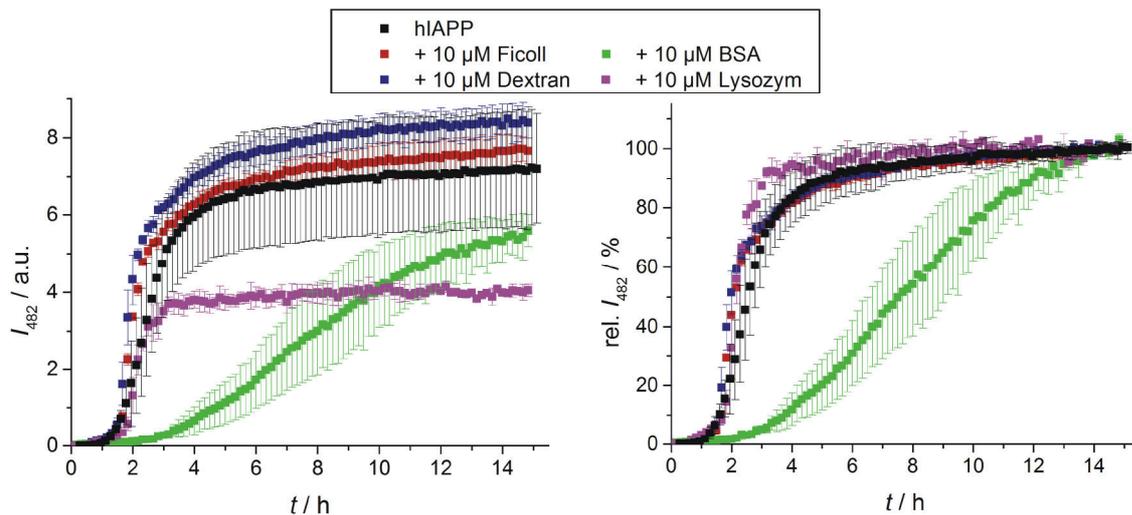


Abbildung 3.24: Zeitabhängige Messungen der Fluoreszenzemission des ThT bei der Aggregation von hIAPP in äquimolarer Lösung mit unterschiedlichen Crowdern (je $c = 10 \mu\text{M}$). Links sind absolute Werte der Fluoreszenzintensität des ThT und rechts die korrespondierenden normierten Daten dargestellt. Nachdruck aus Ref. [198].

Bei Erhöhung der Konzentration an Crowder-Molekülen in den Bereich des natürlichen Crowdings ($c(\text{Crowder}) = 10\text{-}40\%$ (w/v) in $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $10 \mu\text{M ThT}$, $\text{pH } 7,4$) wurde eine signifikante, von der Konzentration der Crowder abhängige Verringerung der maximalen Fluoreszenzintensität des ThT, I_f , als gemeinsamer Effekt aller Crowder detektiert (Abb. 3.25 links und Tab. 3.3), welches auf eine Reduktion der Menge an gebildeten hIAPP-Fibrillen in Anwesenheit der Crowder hindeutet. Im Fall sehr hoher Konzentrationen an Ficoll, Dextran und BSA (40% (w/v)) sowie für alle Messungen mit Lysozym wurde die Aggregationsreaktion von $10 \mu\text{M}$ hIAPP sogar inhibiert.

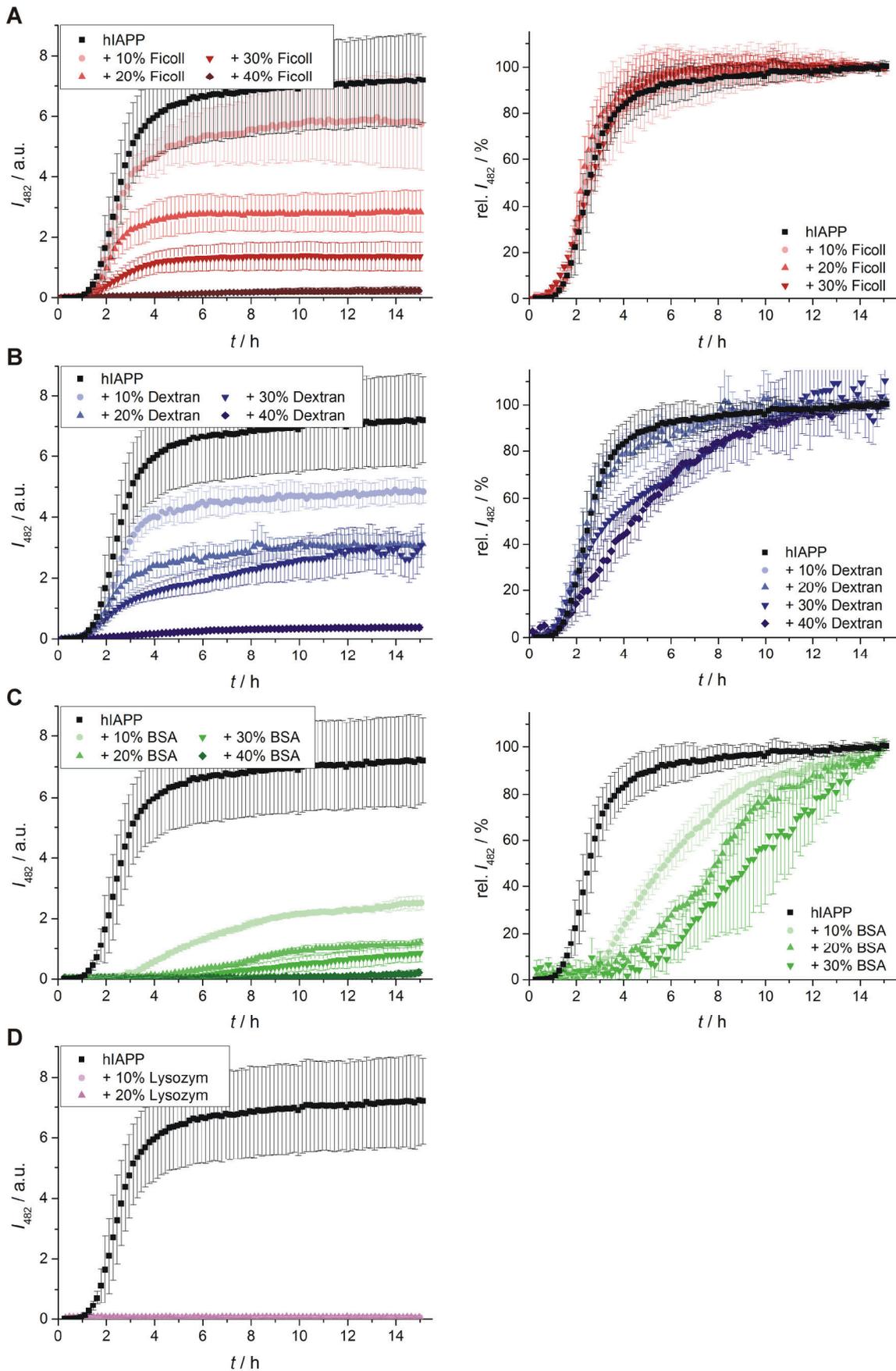


Abbildung 3.25: Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzemission des ThT bei der Aggregation von hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Crowder-Lösungen von Ficoll (A), Dextran (B), BSA (C) und Lysozym (D) in Konzentrationen von 10-40% (w/v). Links: Absolute Werte der Fluoreszenzintensität des ThT. Rechts: Korrespondierende normierte Daten. Nachdruck aus Ref. [198].

Tabelle 3.3: Dauer der lag-Phasen, t_{lag} , apparente Wachstumskonstanten, k_{app} , und maximale Fluoreszenzintensitäten des ThT, I_f , bei der Aggregation des hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Lösung mit unterschiedlichen Arten und Konzentrationen an Crowdern (Nachdruck aus Ref. [198])

	$t_{\text{lag}} / \text{h}$	$k_{\text{app}} / \text{h}^{-1}$	$I_f / \text{a.u.}$
hIAPP	$1,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$7,2 \pm 1,4$
+ 10 μM Ficoll (0,07% Ficoll)	$1,4 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,3$
+ 10% Ficoll	$1,5 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$	$5,7 \pm 1,5$
+ 20% Ficoll	$1,4 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,7$
+ 30% Ficoll	$1,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,5$
+ 40% Ficoll	-*	-*	$0,3 \pm 0,1$
+ 10 μM Dextran (0,07% Dextran)	$1,3 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,3$	$8,4 \pm 0,4$
+ 10% Dextran	$1,6 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,4$
+ 20% Dextran	$1,2 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,4$
+ 30% Dextran	-*	-*	$3,1 \pm 0,7$
+ 40% Dextran	-*	-*	$0,4 \pm 0,1$
+ 10 μM BSA (0,07% BSA)	$2,9 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,0$	$5,6 \pm 0,4$
+ 10% BSA	$2,5 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$
+ 20% BSA	$4,7 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
+ 30% BSA	$5,1 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$
+ 40% BSA	-*	-*	$0,2 \pm 0,1$
+ 10 μM Lysozym (0,01% Lysozym)	$1,7 \pm 0,0$	$4,2 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,2$
+ 10% Lysozym	-*	-*	$0,04 \pm 0,02$
+ 20% Lysozym	-*	-*	$0,05 \pm 0,03$

*Aufgrund der Abweichung der Kurven vom sigmoidalen Verlauf bzw. der vollständigen Inhibition der Aggregation ist die Auswertung der Parameter mit dem verwendeten Modell nicht sinnvoll.

Auf der rechten Seite der Abbildung 3.25 sind auf die finale Fluoreszenzintensität der Messung normalisierte Daten abgebildet, um den Vergleich der Kinetiken der Aggregationsprozesse zu vereinfachen. Obwohl die Menge an gebildeten Fibrillen verringert wurde, ändern sich die Kinetiken der hIAPP-Fibrillenbildung in Anwesenheit aller Konzentrationen von Ficoll (10-30% (w/v)) und geringer Konzentrationen an Dextran (10-20% (w/v)) im Vergleich zum Aggregationsprozess in Abwesenheit von Crowdern nicht; die Dauer der lag-Phasen, t_{lag} , verbleibt bei $\sim 1,4$ h und die apparenten Wachstumskonstanten, k_{app} , bei $\sim 2,1 \text{ h}^{-1}$. Diese unveränderten Kinetiken können möglicherweise der partiellen Bindung von hIAPP-Monomeren an die Crowder und/oder der Stabilisierung von hIAPP-Spezies in kleinen Kavitäten des verbliebenen freien Volumens zugeschrieben werden. In beiden Fällen durchläuft die verbliebene Population an hIAPP den üblichen Aggregationsprozess allerdings mit dem Resultat einer verringerten Fibrillenmenge. Der Verwendung höherer Konzentrationen an Dextran (30-40% (w/v)) folgte die Verlängerung der Wachstumsphasen unter

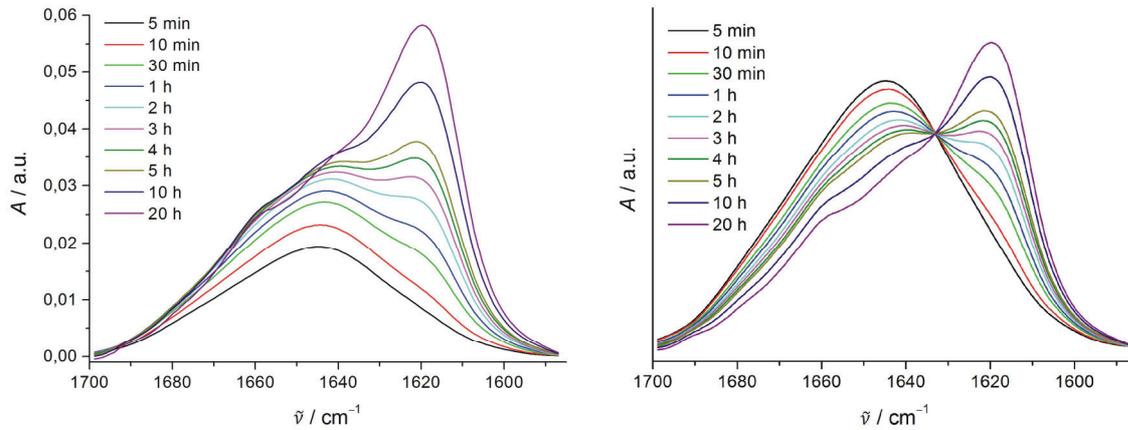
gleichzeitigem Verlust der sigmoidalen Form der Aggregationskurve. Dies deutet auf einen komplexeren Verlauf der Aggregation hin, dem möglicherweise neben den Effekten der Bindung des hIAPP und des ausgeschlossenen Volumens auch diffusionslimitierende Schritte zugrunde liegen, da die Viskosität des Dextrans bei diesen Konzentrationen deutlich höher ist als die des Ficolls. Wurde BSA als Crowder eingesetzt, so wurden verlängerte lag-Phasen – bis zu 5,1 h – sowie verringerte k_{app} -Werte – bis zu $0,5 \text{ h}^{-1}$ – detektiert. Hier scheinen Effekte, wie der des ausgeschlossenen Volumens, eine hohe Viskosität und die drastisch reduzierte Diffusion zusammen mit einer signifikanten Bindung der hIAPP-Monomere an BSA, für die Retardation der Nukleibildung sowie der Fibrillenelongation verantwortlich zu sein.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse die fortwährende Existenz der Aggregationsreaktion und Fibrillenbildung auch im Crowding, aber mit einer von der Konzentration und Art der Crowder abhängigen, drastisch reduzierten Menge an akkumulierten Fibrillen. Dies deutet auf die Bildung stabilisierter hIAPP-Spezies hin, die entweder an die Crowder gebunden oder in kleinen Kavitäten des freien Volumens gefangen und vor allem nicht zur weiteren Aggregation und Fibrillenbildung in der Lage sind.

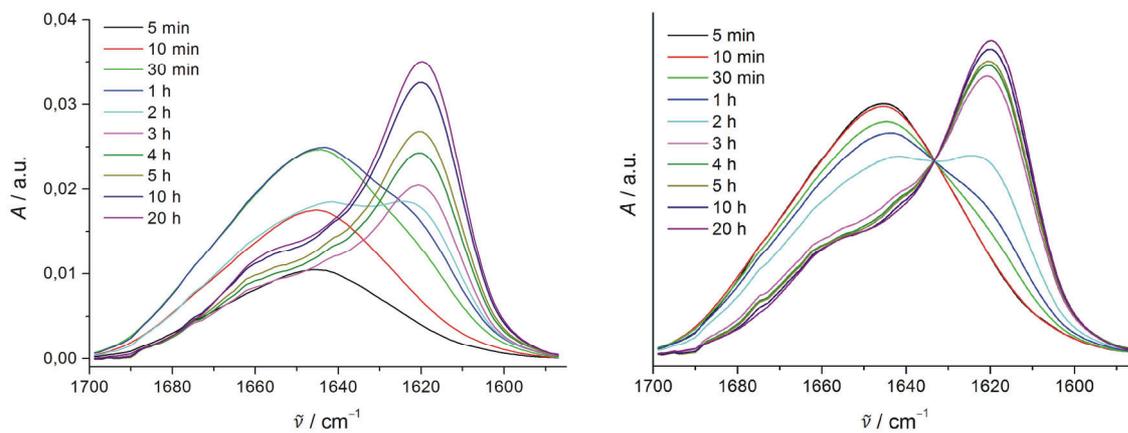
Weitere Informationen über den Mechanismus der Fibrillenbildung wurden über die ATR-FTIR-Spektroskopie und Analyse der Amid-I'-Bande zur Detektion der zeitlichen Änderung der Sekundärstruktur des hIAPP erlangt. Primäre und flächennormierte Spektren der Amid-I'-Bande während der Aggregation des reinen hIAPP in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , pD 7,4 in D_2O) sowie des hIAPP in Puffer mit 20% (w/v) Ficoll oder Dextran sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Der Einfluss der Crowder BSA und Lysozym konnte mittels ATR-FTIR-Spektroskopie nicht untersucht werden, da es sich bei beiden ebenfalls um Proteine handelt, deren Amid-I'-Banden aufgrund der drastisch höheren Konzentrationen die Bande des hIAPP überlagern würden. Für alle drei gemessenen Proben wurde jeweils eine zeitliche Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ nach $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ mit dem Auftreten eines isosbestischen Punktes bei $\sim 1633 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet (Abb. 3.26, rechts). Dies weist auf eine direkte Umwandlung der Sekundärstruktur des hIAPP von einer überwiegend ungeordneten, partiell α -helikalen zu einer hauptsächlich von intermolekularen β -Faltblättern geprägten Konformation hin. In allen drei Fällen bedeutet dies, dass die Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP über einen ähnlichen, dem üblichen Aggregationsprozess entsprechenden, Mechanismus verläuft (vgl. Kapitel 3.1.3). Lediglich Unterschiede in den Intensitäten der Banden der primären ATR-FTIR-Spektren konnten in Anwesenheit der Crowder detektiert werden (Abb. 3.26, links). Die Absorptionsintensität dieser Spektren ist merklich geringer als bei reinem hIAPP und nimmt in Lösungen mit Dextran im zeitlichen Verlauf der Fibrillenbildung sogar noch

ab, welches generell auf eine verringerte Menge an adsorbierten hIAPP-Spezies, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ThT-Assays, zurückzuführen ist.

A hIAPP (ohne Crowder)



B hIAPP + 20% Ficoll



C hIAPP + 20% Dextran

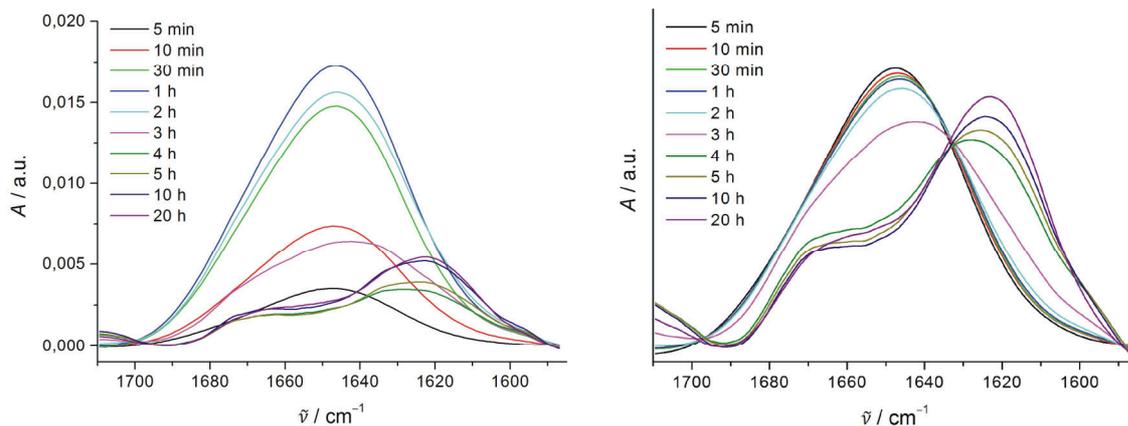


Abbildung 3.26: Primäre (links) und flächennormierte (rechts) ATR-FTIR-Spektren der zeitabhängigen Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von reinem 10 μ M hIAPP (A) und 10 μ M hIAPP in einer Lösung von 20% (w/v) Ficoll (B) bzw. 20% (w/v) Dextran (C). Nachdruck aus Ref. [198].

3.4.4 Charakterisierung der im Crowding gebildeten Spezies

Zur Identifikation der Art und Morphologie der im Crowding gebildeten hIAPP-Spezies wurden AFM-Messungen durchgeführt. Für diese Messungen wurden 50 μ M hIAPP-

Lösungen in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 10 μM ThT, pH 7,4) nach 15 h Inkubation in An- oder Abwesenheit der verschiedenen Crowder untersucht. Um auch bei diesen, im Vergleich zu vorherigen Studien höheren Konzentrationen an hIAPP den Aggregationsprozess des Peptids verfolgen zu können, wurde die Inkubation jeweils in Form fluoreszenzspektroskopischer ThT-Assays durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Proben des ThT-Assays direkt nach der Adsorption auf Glimmerscheiben mittels AFM untersucht. Die entsprechenden zeitabhängigen Ergebnisse der ThT-Assays von 50 μM hIAPP in Lösungen unterschiedlicher Crowder sind in Abbildung 3.27 dargestellt und zeigen ähnliche Aggregationsverläufe, wie sie für die geringere hIAPP-Konzentration ($c = 10 \mu\text{M}$, vgl. Abb. 3.25) detektiert wurden, mit nur geringen Änderungen der Kinetik und der Stärke des inhibitorischen Effekts.

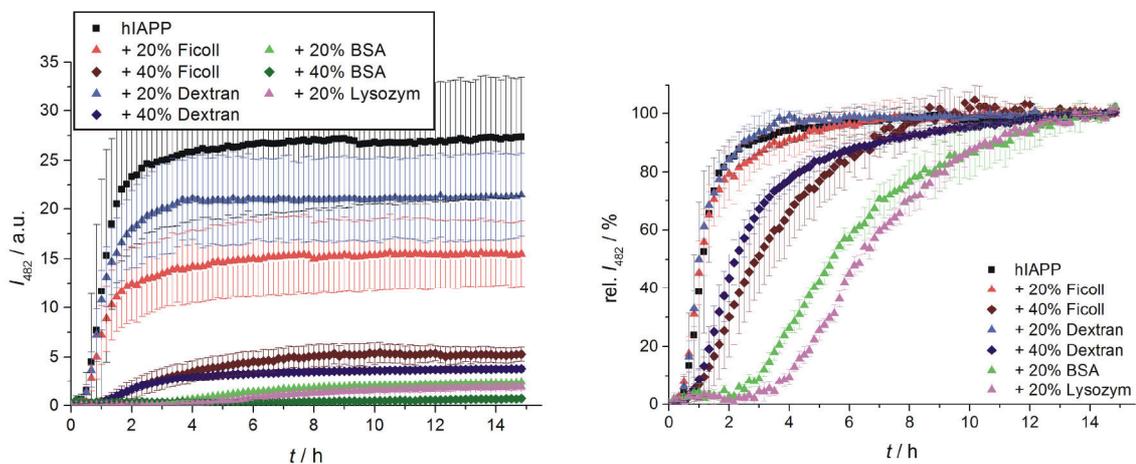


Abbildung 3.27: Verlauf der hIAPP-Aggregation in Crowder-Lösungen für die anschließende Untersuchung mittels AFM. Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzemission des ThT bei der Aggregation von hIAPP ($c = 50 \mu\text{M}$) in unterschiedlichen Crowder-Lösungen mit Konzentrationen von 20 und 40% (w/v). Links: Absolute Werte der Fluoreszenzintensität des ThT. Rechts: Korrespondierende normierte Daten. Nachdruck aus Ref. [198].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für 10 μM hIAPP wurden keine Änderungen der Kinetik im Vergleich zur Aggregation des hIAPP in Abwesenheit von Crowdern für die Aggregation von 50 μM hIAPP in Lösung mit 20% (w/v) Ficoll und Dextran detektiert. Auch hier ist lediglich eine Verringerung der Menge an gebildeten Fibrillen zu verzeichnen, wenn auch nicht im selben Maße wie bei der geringeren hIAPP-Konzentration. Verlängerte Elongationsphasen, anstelle der vollständigen Inhibition der Aggregation, wurden für die Inkubation von 50 μM hIAPP in Lösungen mit 40% (w/v) Ficoll und Dextran beobachtet. Bei der Verwendung von BSA als Crowder wurden, wiederum in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Inkubation von 10 μM hIAPP, bei einer Konzentration von 20% (w/v) verlängerte lag- und Elongationsphasen und bei 40% (w/v) BSA eine vollständige Inhibition der hIAPP-Aggregation detektiert. Die vollständige Inhibition der Fibrillenbildung durch Lysozym, wie sie bei 10 μM hIAPP zu verzeichnen war, wurde für eine Konzentration von 50 μM hIAPP nicht erzielt.

Allerdings wurde hier eine deutliche Reduktion der maximalen Fluoreszenzintensität des ThT, welche auf eine starke Verringerung der Menge an gebildeten hIAPP-Fibrillen hindeutet, erreicht. Insgesamt sind die Ergebnisse somit auch bei unterschiedlicher Konzentration an hIAPP vergleichbar und deuten auf die fortwährende Existenz der Aggregationsreaktion und Fibrillenbildung auch im Crowding hin, jedoch mit einer von der Konzentration und Art der Crowder abhängigen, drastisch reduzierten Menge an akkumulierten Fibrillen.

AFM-Aufnahmen der Probe im Anschluss an die ThT-Assays zeigten die Bildung gereifter Fibrillen mit mittleren Höhen von etwa 6 ± 2 nm bei der Inkubation von hIAPP in Abwesenheit von Crowdern und bei Anwesenheit von 20 und 40% (w/v) Ficoll und Dextran (Abb. 3.28A-C und im Anhang Tab. A.2). Obwohl die Rasterkraftmikroskopie keine geeignete Methode zur präzisen Quantifizierung der Menge an gebildeten Fibrillen darstellt, konnte jedoch qualitativ eine Abnahme der Anzahl an vorhandenen Fibrillen in den Proben mit 40% (w/v) Ficoll und Dextran beobachtet werden, welches auch die Ergebnisse der ThT-Assays mit $50 \mu\text{M}$ hIAPP deutlich widerspiegelt. Im Gegensatz dazu wurden im Fall der Inkubation von hIAPP mit BSA und Lysozym als Crowder hauptsächlich globuläre Spezies detektiert (Abb. 3.28D und E). Diese Spezies konnten in zwei Populationen unterteilt werden: Kleinere Oligomere ($h \approx 0,8 \pm 0,5$ nm) konnten in allen Proben, bei denen BSA oder Lysozym als Crowder eingesetzt wurden, detektiert werden, zusätzliche größere Oligomere mit mittleren Höhen im Bereich der Größe von Fibrillen hingegen nur in Lösung von 40% (w/v) BSA ($h = 4,4 \pm 0,6$ nm) und 20% (w/v) Lysozym ($h = 4,9 \pm 1,3$ nm). Die kleineren globulären Spezies könnten hIAPP-Oligomere darstellen, für die auch im Rahmen anderer Studien in Abwesenheit von Crowdern eine Größe von $\sim 0,8$ nm nachgewiesen worden ist (vgl. Kapitel 3.2.4). Da allerdings eine starke Interaktion von hIAPP mit den Protein-Crowdern mittels FCS und ThT-Assays detektiert wurde, könnten beide Fraktionen, kleinere und größere globuläre Spezies, auch an BSA oder Lysozym gebundenes hIAPP zeigen. Neben diesen globulären Spezies wurden sowohl bei der Aggregation des hIAPP in Lösung mit 20% (w/v) BSA als auch mit 20% (w/v) Lysozym noch einzelne gereifte Fibrillen, die mittlere Höhen von $5,2 \pm 1,0$ nm bzw. $6,1 \pm 2,0$ nm besitzen, nachgewiesen. Somit zeigen die AFM-Daten deutlich, dass weniger Fibrillen im Crowding gebildet werden, die aber, wenn vorhanden, ähnliche morphologische Eigenschaften bezüglich der Struktur, Verzweigung und Größe untereinander aufweisen. Darüber hinaus zeigen sie auch große Ähnlichkeit im Vergleich zu den in verdünnter Lösung gebildeten Fibrillen. Anstelle von Fibrillen traten allerdings vermehrt globuläre Spezies in den Lösungen der Protein-Crowder auf, die anscheinend nicht zur Aggregation in der Lage waren.

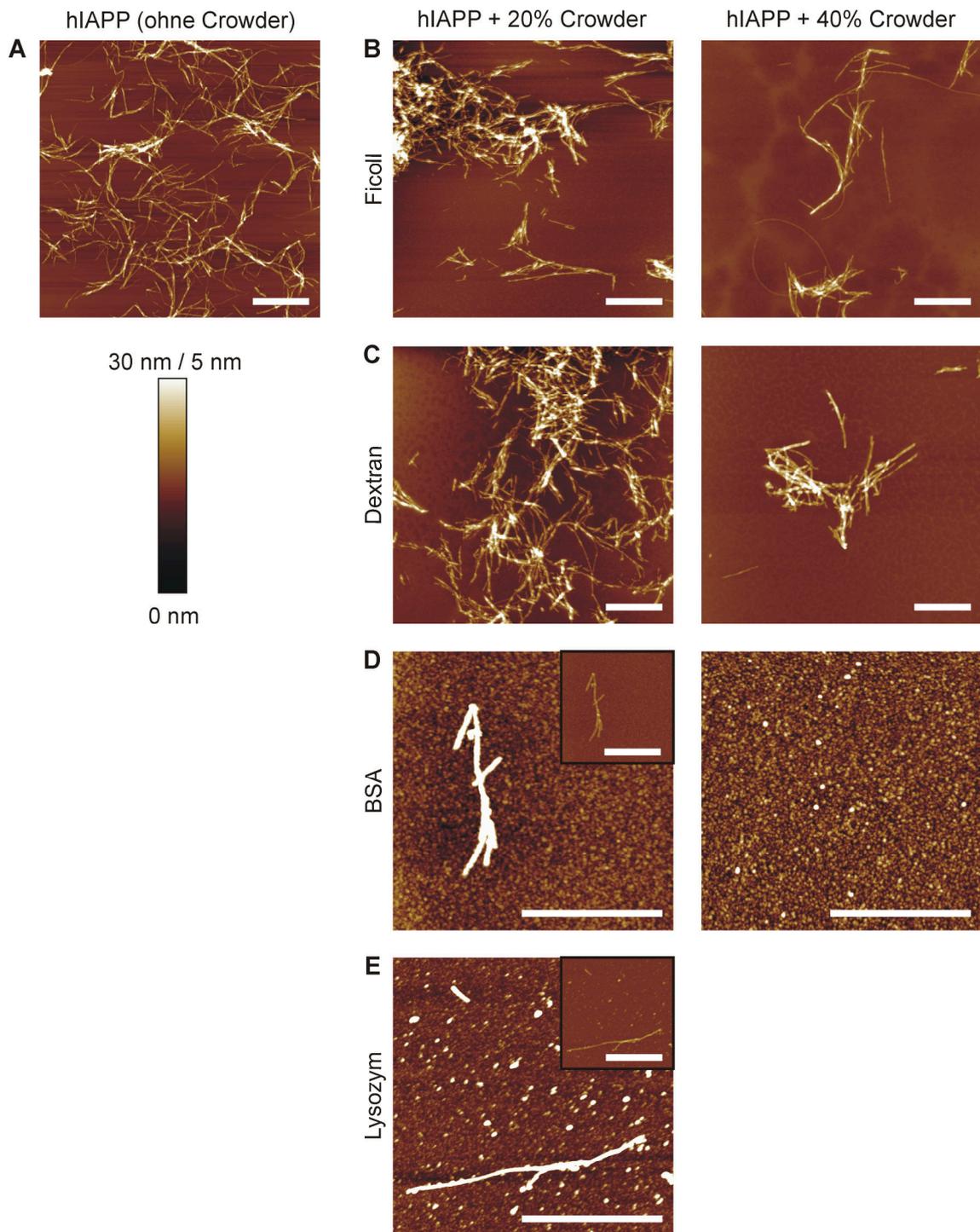


Abbildung 3.28: AFM-Aufnahmen der Strukturen von $50 \mu\text{M}$ hIAPP nach ~ 15 h Inkubation in Lösung in An- und Abwesenheit von Crowdern. **A** Reines hIAPP. **B-E** Inkubation des hIAPP in Lösungen von 20 und 40% (w/v) Ficoll (**B**), Dextran (**C**), BSA (**D**) und Lysozym (**E**). Zum einfacheren Vergleich der Größe fibrillärer Strukturen zeigen die Einfügungen in den linken Bildern von **D** und **E** das identische Bild im gleichen Maßstab wie die Bilder unter **A-C**. Alle Maßstäbe entsprechen $1 \mu\text{m}$. Der Farbbalken repräsentiert eine Höhe von 30 nm für die Aufnahmen **A-C** und 5 nm für die Aufnahmen **D** und **E**. Nachdruck aus Ref. [198].

3.4.5 Zytotoxizität des hIAPP und Einfluss von Lipiden im Crowding

Als Hauptursache der Zytotoxizität gegenüber pankreatischen β -Zellen im Krankheitsbild des Typ II Diabetes mellitus wird die Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP angesehen. Um in diesem Zusammenhang den Einfluss des Crowdings auf die Zytotoxizität des hIAPP zu bestimmen, wurde ein Zellviabilitätstest mit der pankreatischen β -Zelllinie INS-1E durchgeführt (Abb. 3.29A). Als Kontrollen wurden dabei zum einen β -Zellen ohne hIAPP und ohne Crowder (grauer Balken), die als 100% Zellviabilität festgelegt wurden, und außerdem β -Zellen ohne hIAPP aber mit den entsprechenden Konzentrationen an Crowdern (Abb. 3.29B) inkubiert.

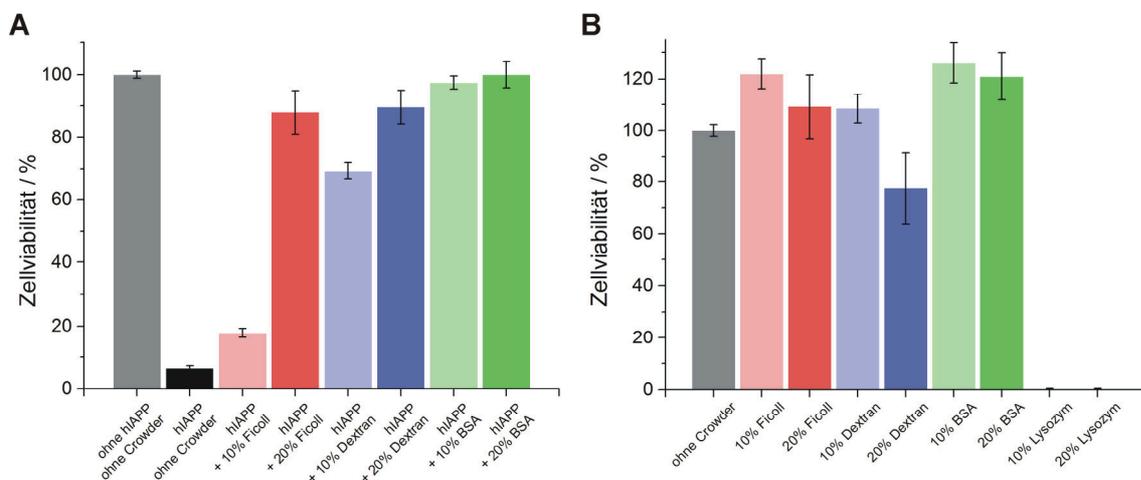


Abbildung 3.29: Effekt des Crowdings auf die Zytotoxizität des hIAPP. **A** Zellviabilität pankreatischer β -Zellen (Zelllinie INS-1E) nach der Inkubation mit hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit verschiedener Crowder-Lösungen von Ficolll (rot), Dextran (blau) und BSA (grün) bei Konzentrationen von 10 und 20% (w/v). **B** Als Kontrolle ist die Zellviabilität der β -Zellen nach Inkubation mit den Crowder-Lösungen von Ficolll (rot), Dextran (blau), BSA (grün) und Lysozym (violett) bei Konzentrationen von 10 und 20% (w/v) allein, d. h. ohne hIAPP, dargestellt. Zum Vergleich ist in beiden Diagrammen die Viabilität der β -Zellen bei Inkubation unter identischen Bedingungen ohne hIAPP und ohne Crowder, die als 100% Wert gesetzt wurde, gezeigt.

Mit Ausnahme von Lysozym, welches selbst toxisch auf die Zellen wirkte, zeigten die Crowder allein keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der β -Zellen. Bei Zugabe von hIAPP in Abwesenheit aller Crowder nahm die Zellviabilität hingegen dramatisch bis auf 6% überlebende Zellen ab (Abb. 3.29A, schwarzer Balken). Wurden Ficolll (rote Balken) oder Dextran (blaue Balken) zusammen mit hIAPP hinzugegeben, nahm die Viabilität im Vergleich zur alleinigen Zugabe von hIAPP konzentrationsabhängig zu, wobei Dextran einen stärker positiven Effekt als Ficolll ausübte. Bemerkenswerterweise zeigten Zellen, die gemeinsam mit hIAPP und BSA als Crowder (grüne Balken) inkubiert wurden, vollständige Viabilität. Somit korrelieren diese Daten nahezu vollständig mit den Mengen an gebildeten Fibrillen, die mittels ThT und AFM-Messungen detektiert wurden, welches zu der Schlussfolgerung führt, dass die

Zellviabilität umso kleiner ist, je mehr Fibrillen gebildet werden. Damit scheinen die stabilisierten globulären hIAPP-Spezies keine Zytotoxizität zu besitzen.

Die Zytotoxizität des hIAPP wird, wie bereits in der Einleitung in Kapitel 1.3.3 beschrieben, auf die Permeabilisierung der Zellmembran der pankreatischen β -Zellen zurückgeführt. Diese wurde bereits in Kapitel 3.1.4 anhand der Permeabilisierung einer isolierten β -Zellmembran durch hIAPP experimentell nachgewiesen. Um nun zu untersuchen, ob zelluläre Lipide die Aggregation des hIAPP im Crowding beeinflussen und so neben dem Crowding selbst ebenfalls einen Effekt auf die beschriebene Verminderung der Zytotoxizität des hIAPP ausüben, wurden weitere ThT-Assays durchgeführt. In diesem Fall wurde der zeitliche Verlauf der Aggregation des hIAPP in einer Lösung (10 mM NaH_2PO_4 , 10 μM ThT, pH 7,4), die Vesikel (0,5 mg/mL LUV) der isolierten β -Zellmembran (vgl. Kapitel 3.1.2) sowie 10-40% (w/v) Ficoll als repräsentativen Crowder enthielt, verfolgt (Abb. 3.30). Wie bereits in den ThT-Assays des hIAPP mit Crowdern in Abwesenheit von Vesikeln (vgl. Abb. 3.25) wurde auch hier eine konzentrationsabhängige Verminderung der maximalen Fluoreszenzintensität des ThT beobachtet, welche auf eine Reduktion der Menge an gebildeten Fibrillen schließen lässt. Darüber hinaus kommt es zu einer signifikanten Verkürzung der lag-Phase der Aggregation. Dieser bekannte Effekt partiell negativ geladener Lipidsysteme [136] und im Speziellen der isolierten β -Zellmembran (vgl. Kapitel 3.1.3) auf die Aggregation des hIAPP beeinflusste die Fibrillenbildung in Ab- und Anwesenheit von Crowdern in gleichem Maße, sodass kein zusätzlicher gemeinsamer Effekt von zellulären Lipiden und Crowdern beobachtet werden konnte.

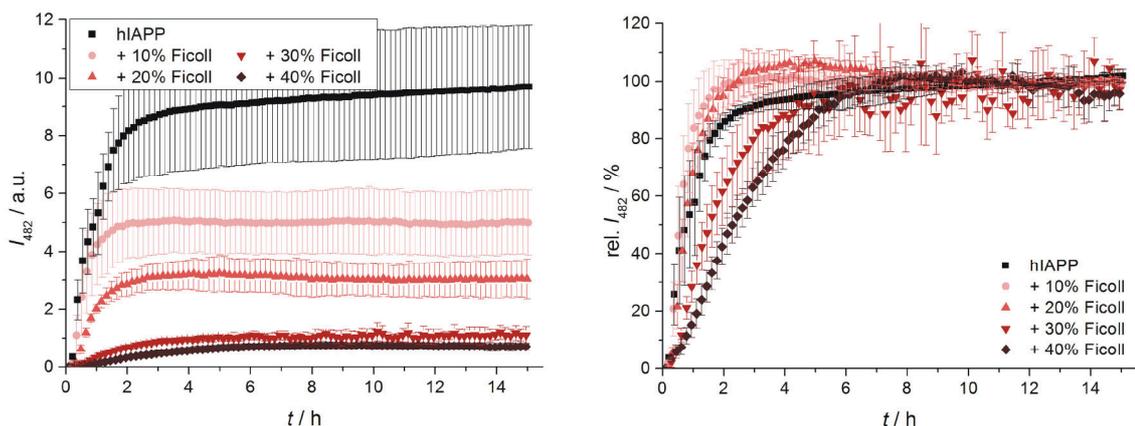


Abbildung 3.30: Einfluss des Crowdings auf die Aggregation des hIAPP an der isolierten β -Zellmembran. Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzemission des ThT bei der Aggregation von hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in einer Lösung mit 0,5 mg/mL Zellmembranvesikeln (isoliert aus pankreatischen β -Zellen der Zelllinie INS-1E) sowie 10-40% (w/v) Ficoll als Crowder. Links: Absolute Werte der Fluoreszenzintensität des ThT. Rechts: Korrespondierende normierte Daten. Nachdruck aus Ref. [198].

3.4.6 Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Studie wurden zwei netzwerkartige Strukturen bildende Polymer-Crowder und zwei globuläre Protein-Crowder verwendet, um den Effekt des Crowdings auf das Aggregationsverhalten des hIAPP zu studieren. Dabei wurde eine drastische, von der Art und Konzentration der Crowder abhängige Suppression und bei sehr hohen Crowder-Konzentrationen sogar eine Inhibition der Fibrillenbildung beobachtet. Die dennoch gebildeten hIAPP-Fibrillen bewahrten auch im Crowding ihre übliche Morphologie. Darüber hinaus konnte zumindest im Fall der Verwendung von Protein-Crowdern mittels AFM eine zweite globuläre hIAPP-Spezies neben den Fibrillen detektiert werden. Diese Spezies stellt wahrscheinlich globuläre hIAPP-Monomere oder Oligomere dar, die an die Crowder gebunden oder in kleinen Kavitäten des freien Volumens stabilisiert wurden und nicht zur weiteren Aggregation und Fibrillenbildung in der Lage sind. Zytotoxizitätsmessungen an der pankreatischen β -Zelllinie INS-1E zeigten weiterhin, dass die Reduktion der Menge an gebildeten hIAPP-Fibrillen auch zur Reduktion der Zytotoxizität des hIAPP führte und somit die Schlussfolgerung nahelegt, dass die detektierten, durch Crowding initiierten globulären hIAPP-Spezies nicht zytotoxisch sind. Diese nicht toxischen hIAPP-Oligomere stellen somit eine deutlich unterschiedliche Spezies als die sonst detektierten zytotoxischen *on-pathway*-Oligomere (vgl. Ref. [31]), dar.

Die Ausbildung transientser Struktur motive, wie β -Schleifen und α -Helices, der nativ zwar hauptsächlich ungeordneten Struktur des monomeren hIAPP könnte den Grund für die Bildung und Stabilisierung der globulären hIAPP-Spezies bilden [24,25]. Wie bereits beschrieben wurde, stabilisiert Crowding vor allem kompakte Konformationen aufgrund des Effekts des ausgeschlossenen Volumens. Somit könnten auch die transienten, partiell gefalteten – und potenziell nicht amyloidogenen – hIAPP-Konformationen durch das Crowding stabilisiert werden und damit zu den beobachteten stabilen, nicht toxischen hIAPP-Spezies führen. Tatsächlich könnte diese Stabilisierung von partiell gefalteten Konformationen des hIAPP auch für die teilweise detektierten verlängerten lag- und Elongationsphasen verantwortlich sein. Ähnliche Ergebnisse, wie hier im Fall des hIAPP beobachtet wurden, konnten auch für Insulin und Histonproteine bei neutralem pH-Wert erhalten werden [201], allerdings sind diese Proteine deutlich größer als hIAPP und wesentlich weniger aggregationsanfällig. Im Gegensatz dazu wurde für die meisten anderen hoch amyloidogenen Peptide, wie α -Synuclein, eine beschleunigte Aggregation im Crowding beobachtet [199,200].

Die geringfügig abweichenden Effekte bei der Verwendung von Ficoll und Dextran als Crowder können den Unterschieden in den Viskositäten der Lösungen beider Crowder bei hohen Konzentrationen zugeschrieben werden, da Dextranlösungen eine deutlich

höhere Viskosität als Ficollösungen aufweisen. Dieser Unterschied liegt in den verschiedenen Untereinheiten der beiden Polysaccharide begründet. Dextran besteht aus stark verzweigten Glukosemolekülen, wohingegen Ficoll ein verzweigtes Kopolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin darstellt. Das unterschiedliche Aggregationsverhalten des hIAPP in Gegenwart von BSA im Vergleich zu Lysozym, beispielsweise die Verlängerung der lag- und Elongationsphasen durch BSA im Unterschied zur direkten Inhibition der hIAPP-Fibrillenbildung durch Lysozym, kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden. Die mit fast 100% deutlich stärkere Bindung von rIAPP an Lysozym, wie sie durch FCS-Messungen detektiert wurde, führte wahrscheinlich zu der stärkeren Suppression der Fibrillenbildung in Lösungen mit Lysozym im Vergleich zu BSA. Darüber hinaus spielen eventuell auch die unterschiedlichen Größen der Proteine ($r_{\text{BSA}} \approx 3,1 \text{ nm}$, $r_{\text{Lys}} \approx 1,7 \text{ nm}$ [196]) eine wichtige Rolle, da deutlich kleinere freie Kavitäten in Lösungen des Lysozyms die Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP unmöglich machen könnten. Die verlängerten lag- und Elongationsphasen, wie sie durch BSA ausgelöst wurden, könnten durch dessen aktuell beobachtete Chaperonaktivität erklärt werden [187]. Der Aggregationsverlauf des hIAPP in einer Lösung von BSA gleicht ferner sehr stark dem der Aggregation des hIAPP in Anwesenheit von SAP (vgl. Kapitel 3.3.2), welchem ebenfalls eine Chaperonaktivität nachgewiesen wurde [177]. In beiden Fällen könnten die Proteine – BSA und SAP – somit in der Lage sein, oligomeres hIAPP zu binden, zu stabilisieren und in seine monomere Konformation zurückzufalten.

Zusammengenommen offenbaren sich zwei konkurrierende Reaktionswege der Aggregation des hIAPP im Crowding, die schematisch in Abbildung 3.31 dargestellt sind. Der horizontale Reaktionsweg stellt dabei den üblichen Aggregationsmechanismus des hIAPP von seiner nativ ungeordneten Konformation über die Bildung von Nuklei und Oligomeren zur Akkumulation von Fibrillen dar. Dieser Reaktionsweg konkurriert, abhängig von der Art und Konzentration der Crowder, mit der Stabilisierung des hIAPP als globuläre, nicht toxische, *off-pathway*-Spezies (Abb. 3.31, vertikaler Reaktionsweg). Aufgrund der Tatsache, dass hIAPP zumindest teilweise an alle verwendeten Crowder bindet, kann der Effekt einzelner Beiträge zum makromolekularen Crowding, wie ausschließlich des ausgeschlossenen Volumens, nicht extrahiert werden. Stattdessen muss eine Vielzahl von Beiträgen, wie unspezifische Wechselwirkungen zusammen mit dem ausgeschlossenen Volumen, der erhöhten Viskosität und den reduzierten Diffusionskonstanten, berücksichtigt werden. Dennoch können aufgrund des Nachweises der schwachen Bindung des hIAPP an Ficoll und Dextran gegenüber der starken Bindung an BSA und Lysozym die Einflüsse des ausgeschlossenen Volumens zumindest annäherungsweise von denen der unspezifischen Wechselwirkung unterschieden werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass im Crowding polymerer Makromoleküle die Einflüsse vom ausgeschlossenen Volumen, der erhöhten

Viskosität und den reduzierten Diffusionskonstanten die Hauptauslöser der Stabilisierung globulärer hIAPP-Spezies sind, wohingegen unspezifische Wechselwirkungen im Fall von Protein-Crowdern überwiegen. In Übereinstimmung mit aktuell publizierten Studien [190,203,207–210] spricht dies für einen ausgewogenen Effekt von ausgeschlossenen Volumen und unspezifischen Interaktionen im Crowding *in vitro* und *in vivo*, wobei der letztendlich sichtbare Effekt von der relativen Stärke der einzelnen Einflüsse abhängig ist.

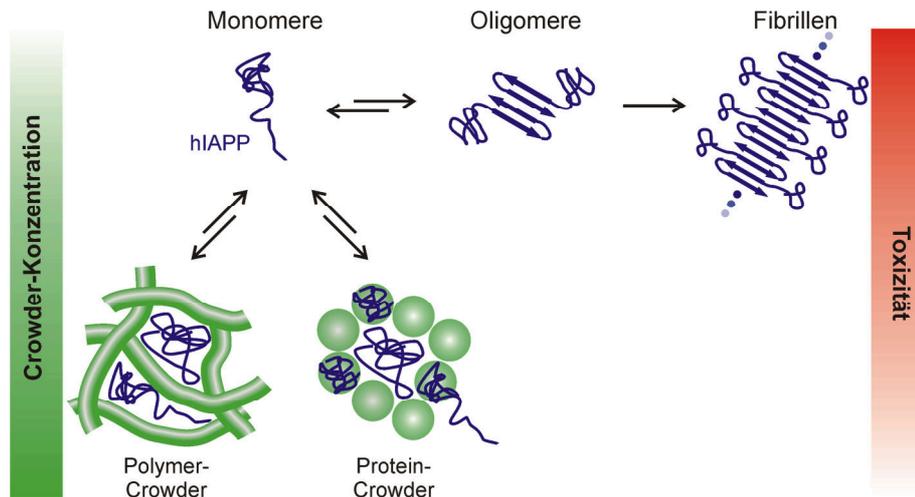


Abbildung 3.31: Konkurrierende Reaktionswege bei der Aggregation des hIAPP im Crowding. Der horizontale Reaktionsweg stellt den üblichen Aggregationsmechanismus des hIAPP von seiner nativ ungeordneten Konformation über die Bildung von Nuklei und Oligomeren zur Akkumulation von Fibrillen dar. Vertikal ist die konkurrierende, vom Typ des Crowders abhängige, Stabilisierung der globulären, nicht toxischen, *off-pathway*-Spezies des hIAPP gezeigt. Nachdruck aus Ref. [198].

Da das native Umfeld der hIAPP-Aggregation das Crowding in der biologischen Zelle darstellt, legt die hier dargestellte Studie nahe, dass zelluläres Crowding in der Lage ist, die monomere oder partiell gefaltete Konformation des hIAPP zu stabilisieren. Folglich wäre hIAPP in diesem Umfeld im Stande, seine physiologische Funktion auszuüben und wäre vor zytotoxischer Aggregation und Fibrillenbildung weitgehend geschützt.

3.5 Einfluss von Kosolvenzien auf die Aggregation des hIAPP*

3.5.1 Hintergrund, Motivation und Zielsetzung

Im vorherigen Kapitel 3.4 konnte unter Zuhilfenahme von Polysacchariden und globulären Proteinen gezeigt werden, dass makromolekulares Crowding in der biologischen Zelle einen signifikanten Einfluss auf die Aggregation, Fibrillenbildung und Toxizität des hIAPP besitzt. Inwieweit auch kleine Moleküle, die in der Zelle beispielsweise als Osmolyte wirken, einen Effekt auf das Aggregationsverhalten des hIAPP ausüben, wurde in der folgenden Studie untersucht. Die Stabilität, Faltung und Aggregation von Proteinen und Peptiden wird *in vivo* von einer Vielzahl physikalisch-chemischer Bedingungen, einschließlich dem Hydratationsgrad und der Anwesenheit von Kosolvenzien, beeinflusst [211–214]. Die Akkumulation bestimmter Kosolvenzien tritt dabei vor allem, aber nicht nur, bei extremophilen Organismen auf, um osmotischem und anderem umweltbedingten Stress, beispielsweise in der Tiefsee, entgegenzuwirken [211,215,216]. Abhängig von der Art und Weise der Wechselwirkung dieser Kosolvenzien mit Proteinen und Peptiden werden sie als kompatible oder nicht-kompatible Solventien bezeichnet. Kompatible Solventien, wie Kohlenhydrate (z. B. Trehalose), Polyole (z. B. Glycerin, Sorbitol, Inositol), Aminosäuren (z. B. Glycin, Prolin, Taurin), Methylamine (z. B. Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Betain) oder Methylsulfoniumverbindungen stabilisieren Proteine durch unspezifische Wechselwirkungen und werden aus diesem Grund häufig auch als chemische Chaperone bezeichnet. Im Gegensatz dazu stellt Harnstoff ein nicht-kompatibles Kosolvenz und Abfallprodukt des Stoffwechsels vieler Organismen dar, welches Proteine im Allgemeinen durch spezifische Wechselwirkungen destabilisiert [211,215–217]. In einigen Meerestieren, wie beispielsweise Elasmobranchii (Haie und Rochen), wurden beide Arten von Kosolvenzien in hohen Konzentrationen gefunden, die von diesen Organismen zur Regulation der Proteinstabilität bei variierenden Umgebungsbedingungen eingesetzt werden. Dabei wurde eine kompensatorische Wirkung vor allem von TMAO oder Betain gegenüber Harnstoff (Abb. 3.32) mit einer maximalen Wirkung im molaren Verhältnis von 1 TMAO zu 2 Harnstoff detektiert [211,216,218]. Stabilisierende Effekte der kompatiblen Kosolvenzien werden dabei im Allgemeinen dem bevorzugten Ausschluss dieser Moleküle von der Proteinoberfläche und der Erhöhung der Ordnung der Wassermoleküle zugeschrieben, welches zu einer

*Die Ergebnisse dieser Studie wurden in Referenz [219] veröffentlicht und werden in diesem Kapitel teilweise wiedergegeben.

[219] Seeliger, J., Estel, K., Erwin, N. & Winter, R. (2013). Cosolvent effects on the fibrillation reaction of human IAPP. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 8902–8907 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

stärker geordneten Hydratationsschicht des Proteins und dadurch eventuell zu einer dichteren Packung der Polypeptidkette führt [214,218,220–222]. Im Gegensatz dazu interagieren proteindenaturierende Moleküle, wie nicht-kompatible Solventien, bevorzugt mit dem Peptidrückgrat (z. B. mit den Carbonylgruppen) und verschiedenen Aminosäureseitenketten und initiieren so bei genügend hoher Konzentration die vollständige oder zumindest partielle Entfaltung des Proteins [223,224].

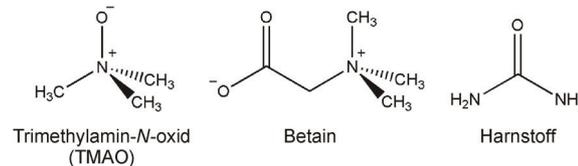


Abbildung 3.32: Molekulare Strukturen der Osmolyte TMAO, Betain und Harnstoff. Nachdruck aus Ref. [219].

Da Kosolvenzien auch die Konformation und transiente Faltung kleiner ungeordneter Peptide beeinträchtigen, könnten sie auch eine wichtige Rolle bei der Aggregation und Fibrillenbildung amyloidogener Peptide, wie hIAPP, spielen. Aus diesem Grund wurde in der hier dargestellten Studie der Einfluss stabilisierender (TMAO und Betain) und destabilisierender (Harnstoff) Kosolvenzien, sowie Mischungen derselben in unterschiedlichen Verhältnissen auf das Aggregationsverhalten des hIAPP untersucht. Die experimentelle Durchführung der entsprechenden Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Kathrin Estel und Nelli Erwin (Bachelorstudentinnen am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I).

3.5.2 Aggregationskinetik des hIAPP in Kosolvenzlösungen

Zunächst wurden zeitabhängige fluoreszenzspektroskopische Messungen des Anstiegs der ThT-Fluoreszenzintensität durchgeführt, um die Aggregationskinetiken von 10 μM hIAPP in Ab- und Anwesenheit der drei unterschiedlichen Kosolvenzien jeweils in Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 10 μM ThT, pH 7,4) zu untersuchen (Abb. 3.33A-C). Bei der Verwendung des destabilisierenden Kosolvenz Harnstoff während der Aggregation des hIAPP wurde eine signifikante, konzentrationsabhängige Verlängerung der lag-Phase der Aggregation ($t_{\text{lag}} = 2,0 \pm 0,2$ h bzw. $t_{\text{lag}} = 3,8 \pm 0,2$ h für 1 M und 2 M Harnstoff) im Vergleich zum reinen hIAPP ($t_{\text{lag}} = 1,2 \pm 0,1$ h) beobachtet (Abb. 3.33A). Darüber hinaus wurde auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Fibrillen konzentrationsabhängig von $k_{\text{app}} = 1,7 \pm 0,1$ h⁻¹ für reines hIAPP zu $k_{\text{app}} = 0,8 \pm 0,0$ h⁻¹ für hIAPP in Lösung mit 2 M Harnstoff verlangsamt ($k_{\text{app}} = 1,3 \pm 0,0$ h⁻¹ für 1 M Harnstoff). Dieses Verhalten weist auf eine Stabilisierung des hIAPP durch Harnstoff in seiner ungeordneten monomeren Konformation hin, welches zur Retardation der Bildung von Nukleationskeimen und somit zur Verlängerung der Nukleations- und Elongationsphase führt.

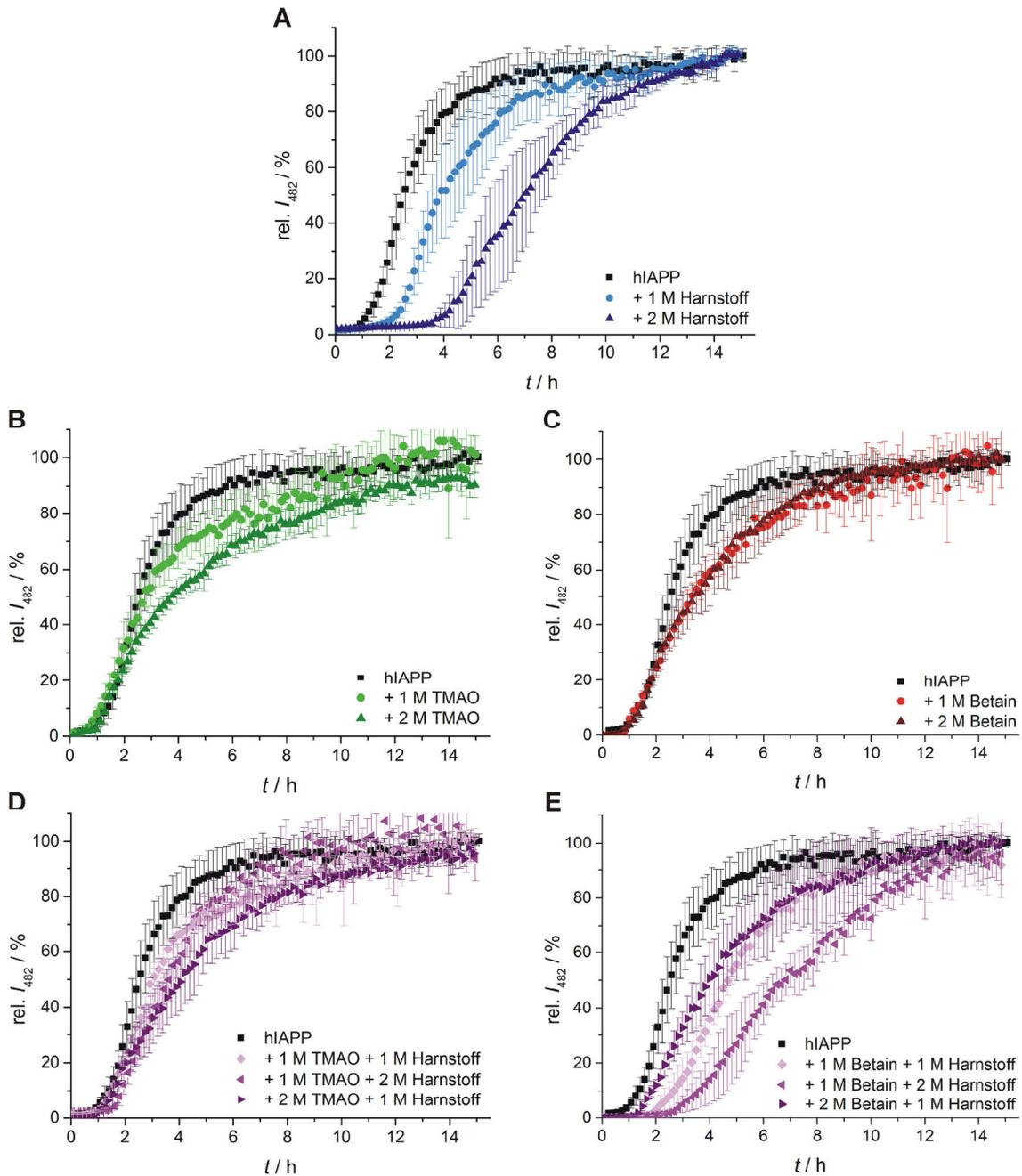


Abbildung 3.33: Zeitabhängige relative Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation von 10 μM hIAPP in Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen und Verhältnissen von Harnstoff (A), TMAO (B), Betain (C), TMAO + Harnstoff (D) und Betain + Harnstoff (E). Nachdruck aus Ref. [219].

Im Gegensatz dazu wurde bei der Zugabe verschiedener Konzentrationen (1 M und 2 M) der stabilisierenden Kosolvenzien TMAO und Betain ein Verlust des sigmoidalen Verlaufs der Aggregationskurven des hIAPP bei gleichbleibender Dauer der lag-Phasen ($t_{\text{lag}} \approx 1,2 \text{ h}$) und Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeiten der Fibrillen detektiert (Abb. 3.33B und C). Da diese Aggregationskurven nicht mehr dem typischen sigmoidalen Kurvenverlauf der Fluoreszenzzunahme des ThT folgen, kann eine quantitative Auswertung der Kurven, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, nicht erfolgen. Dies lässt darauf schließen, dass die Aggregation des hIAPP in Anwesenheit der

stabilisierenden Kosolvenzien nicht mehr vollständig dem Modell der nukleations-induzierten Polymerisation entspricht. Stattdessen scheint der Wachstumsprozess der Fibrillen aufgrund der Stabilisierung von hIAPP-Oligomeren oder Protofibrillen durch die Kosolvenzien TMAO und Betain behindert zu werden. Im Vergleich zu Betain ist der Effekt des TMAO dabei konzentrationsabhängig und ausgeprägter.

Zur Untersuchung eines möglichen aufhebenden Effekts von TMAO und Betain gegenüber der Wirkung von Harnstoff bei Einsatz einer Mischung der entsprechenden Kosolvenzien wurden identische Messungen der Fluoreszenzintensität des ThT während der hIAPP-Aggregation in Lösungen von TMAO/Harnstoff- bzw. Betain/Harnstoff-Mischungen durchgeführt (Abb. 3.33D und E). Es wird deutlich, dass TMAO in der Lage ist, den Einfluss des Harnstoffs auf die Aggregation des hIAPP vollständig zu kompensieren. Selbst in einem Verhältnis von 1:2 TMAO zu Harnstoff kann TMAO die durch 2 M Harnstoff initiierte Verlängerung der lag-Phase völlig aufheben. Im Gegensatz dazu kompensiert das ebenfalls stabilisierend wirkende Betain den Effekt des Harnstoffs nur geringfügig. In beiden Fällen bleiben jedoch die für TMAO und Betain charakteristischen Abweichungen vom sigmoidalen Verlauf der Aggregation mit verlangsamten Elongationsphasen der Fibrillenbildung erhalten. Diese Resultate stimmen gut mit Ergebnissen der kompensierenden Wirkung von TMAO gegenüber Harnstoff aus Proteinfaltungsstudien überein [214,218,222] und weisen auf eine direkte Interaktion von TMAO und Harnstoff, unabhängig von der Interaktion mit den Polypeptiden selbst, hin.

3.5.3 Sekundärstrukturumwandlung und Morphologie gebildeter Spezies

Um die Morphologie und Art der in den verschiedenen Kosolvenzlösungen gebildeten hIAPP-Spezies zu ermitteln, wurden AFM-Messungen durchgeführt. Da für diese Messungen eine höhere Konzentration an hIAPP verwendet werden musste, wurden 50 μM hIAPP für ~ 15 h in den unterschiedlichen Kosolvenzlösungen in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 10 μM ThT, pH 7,4) inkubiert, bevor das auf Glimmerscheiben adsorbierte hIAPP getrocknet und im Anschluss vermessen wurde. Repräsentative AFM-Aufnahmen der gebildeten hIAPP-Spezies sind in Abbildung 3.34 dargestellt. Die detektierten Fibrillen, die als alleinige hIAPP-Spezies in allen Proben gefunden wurden, unterscheiden sich nicht signifikant in ihren mittleren Höhen, die im Bereich von 5,6 bis 7,7 nm liegen (Details in Tab. A.3 im Anhang). Darüber hinaus bleibt auch die Form der in Lösungen von Kosolvenzien gebildeten Fibrillen bezüglich Struktur und Verzweigung weitestgehend unverändert im Vergleich zu hIAPP-Fibrillen, die in reinem Puffer gebildet wurden. Lediglich Fibrillen, die in einer Mischung aus TMAO und Harnstoff im Verhältnis 1:2 inkubiert wurden, zeigen einen vergleichsweise großen

Anteil kürzerer Fibrillen. Dies lässt sich möglicherweise auf die hohe absolute Konzentration an zusätzlich in Lösung befindlichen Kosolvenzmolekülen zurückführen, die zu einer Art Crowding-Effekt auf die hIAPP-Aggregation führt. Zusammen mit den Ergebnissen der ThT-Assays zeigen diese Daten, dass die verwendeten Kosolvenzien lediglich die Kinetik der hIAPP-Aggregation beeinflussen ohne dabei einen merklichen Einfluss auf die finale fibrilläre Struktur der Aggregate auszuüben.

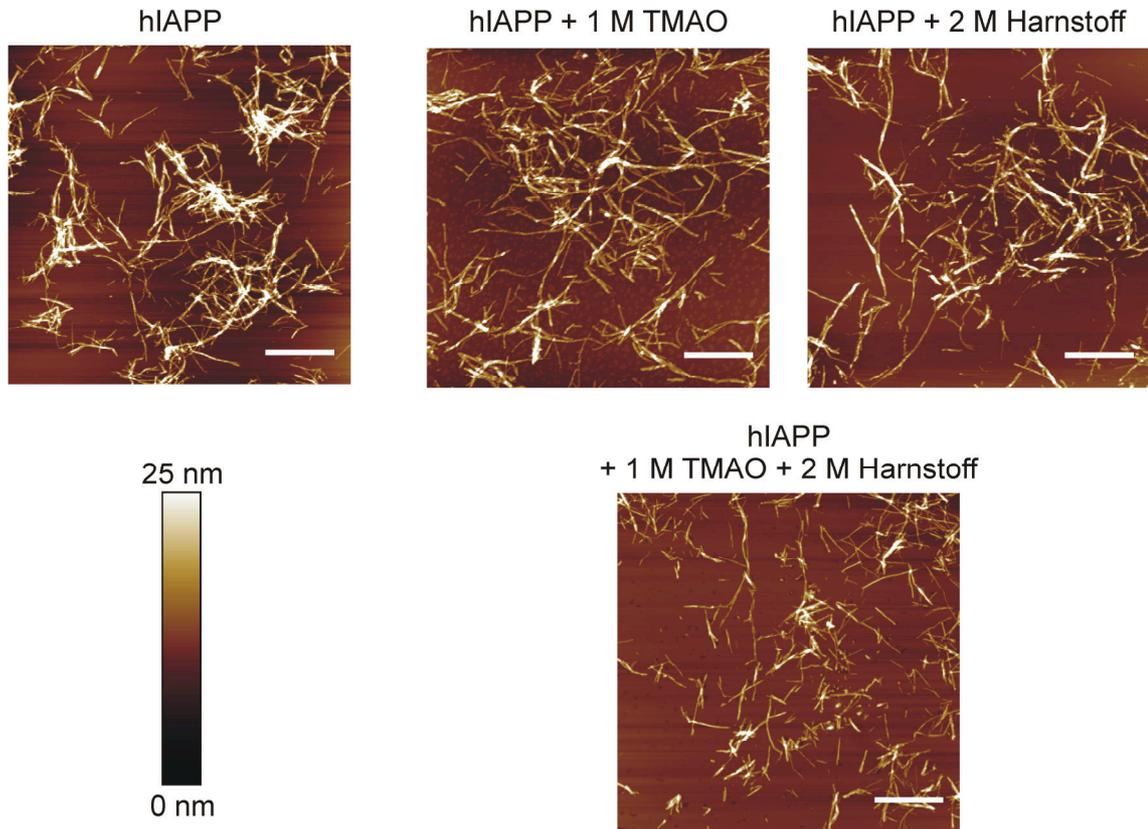


Abbildung 3.34: AFM-Aufnahmen der fibrillären Strukturen des hIAPP ($c = 50 \mu\text{M}$) nach 15 h Inkubation in An- und Abwesenheit der Kosolvenzien TMAO und Harnstoff. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils 1 μm . Nachdruck aus Ref. [219].

Um zu bestätigen, dass der Aggregationsmechanismus und die finale fibrilläre Struktur des hIAPP, in Form der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen, ebenfalls nicht von Kosolvenzien beeinträchtigt werden, wurden ATR-FTIR-spektroskopische Messungen vorgenommen. Entsprechende flächennormierte Spektren der Amid-I'-Bande des hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , pD 7,4 in D_2O) sowie in Puffer, der 1 M TMAO, 2 M ^{13}C -Harnstoff oder eine Mischung aus beiden enthielt, sind in Abbildung 3.35 gezeigt. Harnstoff, dessen Carbonylkohlenstoff das Isotop ^{13}C bildet, wurde in diesen Messungen verwendet, da die Carbonylstreckschwingung des ^{12}C -Harnstoffs mit ihrer maximalen Intensität bei $\sim 1618 \text{ cm}^{-1}$ in D_2O aufgrund der hohen verwendeten Konzentrationen die Amid-I'-Bande des hIAPP überlagern würde. Die Verwendung des ^{13}C -Isotops führt dabei aufgrund seiner höheren Masse zur Verschiebung des Maximums der Carbonylschwingung des Harnstoffs zu einer

geringeren Wellenzahl von $\sim 1562\text{ cm}^{-1}$, die außerhalb des Bereichs der Amid-I'-Bande liegt.

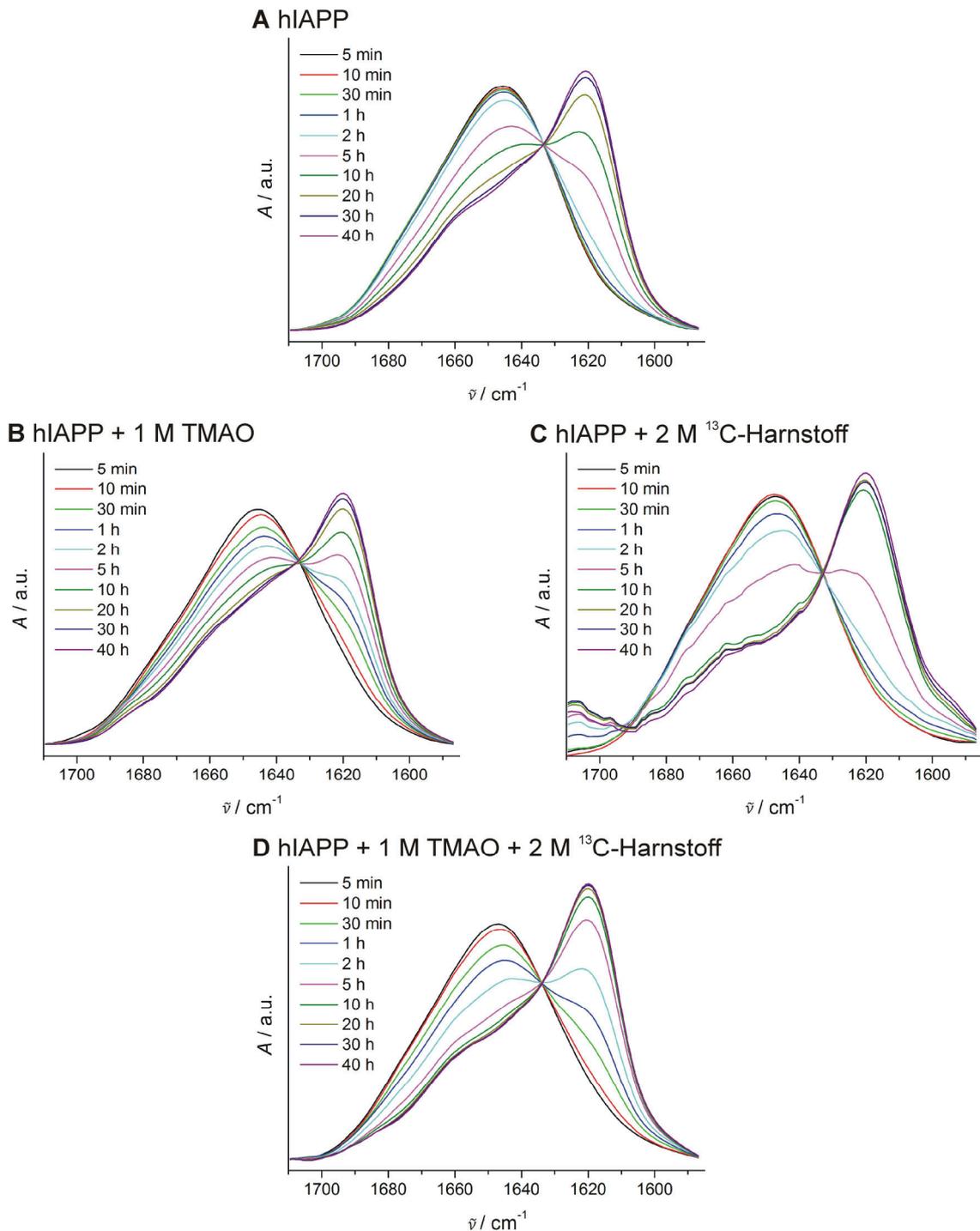


Abbildung 3.35: Flächennormierte ATR-FTIR-Spektren der zeitabhängigen Verschiebung der Amid-I'-Bande des hIAPP ($c = 10\ \mu\text{M}$) allein (A), in Lösung mit TMAO (B), ^{13}C -Harnstoff (C) und beiden Kosolventen (D). Nachdruck aus Ref. [219].

In allen gemessenen Proben wurde jeweils eine Umwandlung der Sekundärstruktur des hIAPP von einer überwiegend ungeordneten, partiell α -helikalen zu einer hauptsächlich von intermolekularen β -Faltblättern geprägten Konformation hin beobachtet. Darauf weist die zeitliche Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$

nach $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ mit dem Auftreten eines isosbestischen Punktes bei $\sim 1633 \text{ cm}^{-1}$ hin. Somit scheint die Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP in den gewählten Kosolvenzlösungen über einen ähnlichen, dem üblichen Aggregationsprozess bezüglich der entstehenden Spezies und dem Prozess selbst entsprechenden Mechanismus zu verlaufen.

3.5.4 Zusammenfassung und Diskussion

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel kurz erwähnt, scheint TMAO gemäß experimenteller und molekulardynamischer Simulationsstudien die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Struktur, die Wassermoleküle untereinander ausbilden, zu erhöhen, d. h. es dient als „Strukturgeber des Wassers“ [218,225–230]. In Anwesenheit von Proteinen ist die direkte Interaktion zwischen den Proteinen und dem Osmolyt ungünstig, hier bewirkt der Ausschluss des TMAO von der Oberfläche der Proteine eine Erhöhung der Proteininstabilität [214,218,220–222]. Diese Art kompatibler Kosolvenzien erhöht folglich die Energiebarriere der Proteinfaltung, reduziert die Population von Faltungsintermediaten und verlangsamt im Allgemeinen die Aggregation von Proteinen. Im Fall von nativ ungeordneten Peptiden, wie hIAPP, können diese Effekte allerdings nicht eintreten. Hier wurde in Lösungen mit TMAO, und weniger ausgeprägt auch in denen mit Betain, eine Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit der hIAPP-Fibrillen bei im Wesentlichen unveränderter Dauer der lag-Phase beobachtet. Dieses Verhalten deutet auf die Stabilisierung oligomerer oder protofibrillärer Strukturen durch die kompatiblen Kosolvenzien hin. Darüber hinaus werden in Lösungen geringer Polarität, wie in TMAO-Lösungen, hydrophobe Wechselwirkungen, die die native Struktur oder Peptidaggregate stabilisieren, geschwächt und gleichzeitig möglicherweise lokale Wasserstoffbrückenbindungen gestärkt [231], welches zur deutlichen Reduktion der detektierten Wachstumsrate führen könnte.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wurde in Lösungen mit Harnstoff eine konzentrationsabhängige Verlängerung der lag-Phase der hIAPP-Aggregation detektiert, welche auf eine Stabilisierung des hIAPP in seiner nativen monomeren Konformation und der temporären Inhibition der Bildung von Nukleationskeimen hindeutet. Dieser Effekt kann durch die bevorzugte Solvation des Peptids durch Harnstoff, die Herabsetzung des hydrophoben Effekts und die direkte Bindung des Harnstoffs an das Peptidrückgrat und polare Aminosäureseitenketten erklärt werden [223,224]. Auch der Einfluss des Harnstoffs auf Wasser ist deutlich unterschiedlich zu dem des TMAO. Neutronenstreuungsexperimente haben gezeigt, dass es keine signifikante Präferenz in der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen selbst und Harnstoff gibt und dass Harnstoff problemlos in die Wasserstruktur eingebaut werden kann [229]. Weiterhin wurde ein geringfügiger

Einbruch der zweiten Hydrathülle durch Harnstoff beobachtet [227], wohingegen der gegenteilige Effekt für wässrige TMAO-Lösungen beschrieben wurde [229]. Somit kann Harnstoff als moderater „Strukturbrecher des Wassers“, im Gegensatz zu TMAO als „Strukturgeber des Wassers“, charakterisiert werden [225,229].

Bei der Zugabe von Harnstoff zu einer wässrigen TMAO-Lösung wurde eine Relaxation des TMAO-Wasser-Netzwerkes beobachtet, wobei die Additivität der Effekte beider Kosolvenzien durch eine direkte, wenn auch schwache, Interaktion zwischen TMAO und Harnstoff erklärt werden kann [229,230]. In wässrigen TMAO/Harnstoff-Lösungen wird dabei eine Wasserstoffbrücke zwischen einem Wasserstoffatom einer Amidgruppe des Harnstoffs und dem Sauerstoffatom des TMAO ausgebildet (vgl. Abb. 3.32) [229,230]. Dieser kompensatorische Effekt scheint auch im Fall des Einflusses einer Mischung der beiden Kosolvenzien TMAO und Harnstoff auf die lag-Phase und Wachstumsrate der Fibrillenbildung des hIAPP wirksam zu sein. TMAO ist dabei in der Lage, die durch Harnstoff induzierte verlängerte lag-Phase der hIAPP-Aggregation vollständig zu kompensieren. Im Gegensatz dazu kann das größere Molekül Betain dem Effekt des Harnstoffs nur marginal entgegenwirken. Diese Resultate stimmen gut mit Ergebnissen der kompensierenden Wirkung von TMAO gegenüber Harnstoff aus Proteinfaltungsstudien überein [214,218,222]. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse der ThT-Assays, ATR-FTIR- und AFM-Messungen, dass die verwendeten Kosolvenzien ausschließlich die Aggregationskinetik des hIAPP beeinflussen, ohne die finale Morphologie der Fibrillen oder den Mechanismus der Fibrillenbildung signifikant zu verändern.

Insgesamt zeigt diese Studie, dass die biologische Zelle durch die Änderung des intrazellulären Milieus in der Lage ist, nicht nur die Stabilität, sondern auch die Aggregationseigenschaften von Peptiden und Proteinen feinstufig abzustimmen. Kleinste Veränderungen dieser Umgebung können demnach allerdings auch zur potentiell toxischen Stabilisierung fehlgefalteter Proteine/Peptide oder zur Denaturierung von Proteinen/Peptiden führen, jeweils gefolgt von der Aggregation und Anhäufung der Spezies. Gerade für amyloidogene Peptide liegt die Zytotoxizität der gebildeten Aggregate maßgeblich in ihrer jeweiligen Struktur und Oberflächenbeschaffenheit begründet und kann abhängig von der Art des Verlaufs ihrer amyloidogenen Aggregation variieren. So kann, wie in dieser Studie gezeigt wurde, auch die Solvatation der Peptide Einfluss auf die Bildung von Nukleationskeimen, die Geschwindigkeit und den Mechanismus des folgenden Wachstumsprozesses sowie möglicherweise deren Toxizität ausüben. Die direkte Bestimmung der Zytotoxizität der in Kosolvenzlösung gebildeten hIAPP-Spezies, wie in Kapitel 3.4.5 im Fall des Crowding durchgeführt, konnte im Rahmen dieser Studie leider nicht erfolgen, da alle

drei Kosolvenzien (TMAO, Betain und Harnstoff) selbst zytotoxisch auf die verwendeten pankreatischen β -Zellen wirkten.

3.6 Molekulare Inhibition der hIAPP-Aggregation

3.6.1 Hintergrund, Motivation und Zielsetzung

Das letztendliche Ziel jeder Grundlagenforschung im Bereich des Diabetes mellitus und der Proteinablagerungserkrankungen, wie auch im Zusammenhang jeglicher anderer Erkrankungen, ist es, einen Beitrag zur Entwicklung therapeutischer Ansätze zu liefern, die möglichst die Ursache und nicht nur Symptome der Krankheit behandeln. Großes Potential zeigen oftmals kleine organische Moleküle (*small molecule inhibitors*), die aus großen, mehrere tausend verschiedene Moleküle umfassenden Substanzbibliotheken über Screeningverfahren ausgewählt und anschließend über Studien der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR, *Structure-activity relationship*) verbessert werden. Ein solches kleines organisches Molekül mit der Bezeichnung anle138b [3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromphenyl)-1H-pyrazol] wurde als neuartiger Inhibitor der Bildung pathologischer Oligomere der Isoform PrP^{Sc} des **Prion-Proteins** (PrP) sowie des **α -Synuclein** (α -Syn) *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Abb. 3.36). Aggregate des PrP^{Sc} und des α -Synucleins treten als toxische Proteinablagerungen in mit Prionen assoziierten Erkrankungen bzw. Synucleinopathien auf [232].

Prionen-assoziierte Erkrankungen sind beispielsweise die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, die Scrapiekrankheit oder die bovine spongiforme Enzephalopathie, die durch die Ablagerung der fehlgefalteten, aggregierten, β -faltblattreichen PrP^{Sc}-Isoform (*prion protein scrapie*) des nativen zellulären Membranglykoproteins PrP^C (*prion protein cellular*) verursacht werden [233,234]. PrP^{Sc} scheint dabei sowohl als Templat für die Strukturumwandlung des nativen PrP^C zum PrP^{Sc}, als auch als neurotoxische Spezies, die den Zelltod und neuronale Störungen verursacht, zu wirken [233,234]. Auch Synucleinopathien, wie Morbus Parkinson oder Lewy-Körper-Demenz, werden durch neuronale Ablagerungen – in diesem Fall des aggregierten α -Synucleins – und der damit einhergehenden Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra (ein Bereich des Mittelhirns) ausgelöst [235,236]. Diese, wie auch viele andere Proteinablagerungserkrankungen, teilen wichtige molekulare Eigenschaften, zu denen neben der Ausbildung amyloider Fibrillen [16,237] auch die Erkenntnis zählt, dass nicht die fibrillären Aggregate, sondern pathologische Oligomere die zytotoxische Spezies bilden [17,238,239]. Aus diesem Grund wurde das Screeningverfahren, aus dem das Inhibitor-molekül anle138b hervorgegangen ist, speziell auf die Entwicklung kleiner organischer Moleküle zur Inhibition der Bildung pathologischer Oligomere ausgerichtet, um damit

eine mögliche therapeutische Strategie zur Behandlung der Ursache dieser und weiterer Proteinablagerungserkrankungen zu bieten [232].

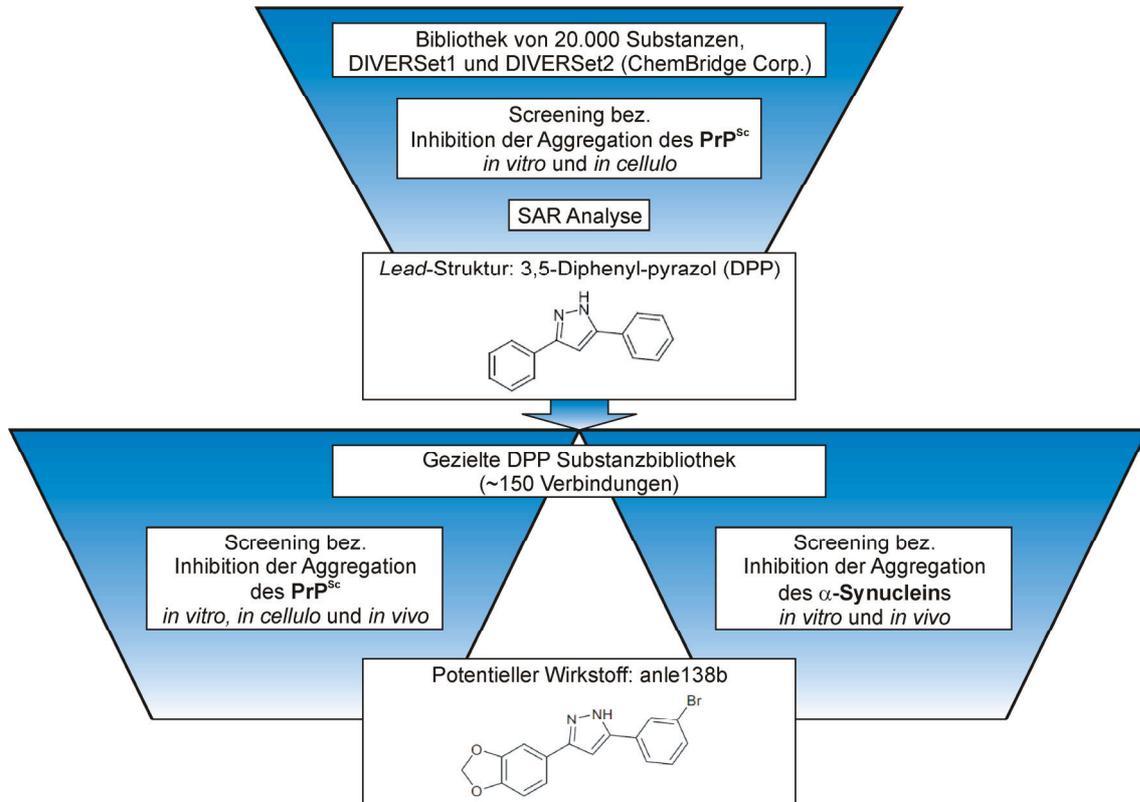


Abbildung 3.36: Schematische Darstellung des Screeningverfahrens zur Entwicklung des molekularen Inhibitors anle138b. Modifiziert nach Ref. [232].

Zur Entwicklung des Inhibitormoleküls anle138b wurden in einer ersten Projektphase verschiedene 3,5-Diphenyl-pyrazol-(DPP)-Derivate als Gruppe aktiver Verbindungen charakterisiert (Abb. 3.36). Der Ansatz basierte auf einem Hochdurchsatz-Screening von 20.000 chemisch unterschiedlichen, wirkstoffähnlichen Molekülen bezüglich der Inhibition der Aggregation des PrP^{Sc}. Daraufhin erfolgte die Synthese einer gezielten DPP-Substanzbibliothek von ~150 unterschiedlichen Verbindungen, die zunächst *in vitro* und *in cellulo* bezüglich ihrer therapeutischen Wirkung auf die Aggregation des PrP^{Sc} und des α -Synucleins getestet wurden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Tests wurden 38 Verbindungen für *in vivo* Untersuchungen der Wirksamkeit auf den Krankheitsverlauf in mit Prionen infizierten Mausmodellen eingesetzt. In diesen Experimenten zeigte die Verbindung anle138b die höchste Anti-Prionen-Aktivität und außerdem eine Wirksamkeit gegenüber Mausmodellen von Synucleinopathien. Untersuchungen der mechanistischen Wirkung des anle138b *in vitro* offenbarten eine strukturabhängige Bindung an pathologische Aggregate und die Inhibition der Bildung toxischer Oligomere des PrP^{Sc} sowie des α -Synucleins [232].

Da auch Diabetes mellitus zu den Proteinablagerungserkrankungen zählt und bei dessen pathologischem Verlauf ebenfalls Oligomere des verursachenden Peptids hIAPP als

zytotoxische Spezies angesehen werden [22,23,30,31], liegt es nahe, molekulare Inhibitoren, die Potential gegenüber α -Synuclein und/oder PrP^{Sc} gezeigt haben, auch auf ihre Inhibitionsfähigkeit gegenüber der hIAPP-Aggregation zu testen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen), die 21 ausgewählte Inhibitormoleküle hauptsächlich aus der Gruppe der 38 *in vivo* an mit Prionen infizierten Mausmodellen getesteten Verbindungen zur Verfügung stellte, wurden dazu erste Inhibitionsstudien mittels fluoreszenzspektroskopischer ThT-Assays an hIAPP durchgeführt.

3.6.2 Screening potentieller Inhibitoren

Zunächst sollte ein Überblick über den Effekt der potentiellen Inhibitormoleküle auf die Aggregation des hIAPP erlangt werden. Dazu wurde die zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation von 10 μ M hIAPP in äquimolarer Lösung bzw. im doppelten Überschuss der Inhibitormoleküle ($c = 10$ bzw. 20 μ M, Stocklösungen 1 bzw. 2 mM in DMSO) im Vergleich zum reinen hIAPP jeweils in Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 10 μ M ThT, pH 7,4, 1% (v/v) finale DMSO-Konzentration) bestimmt (Abb. 3.37A). Die Auswertung dieser Aggregationskurven erfolgte, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, anhand der Bestimmung der Dauer der lag-Phase der Aggregation, t_{lag} , der apparenten Wachstumskonstanten, k_{app} , sowie der final erreichten Fluoreszenzintensität, I_f , welche ein Maß für die Menge an gebildeten Fibrillen und somit ein wichtiges Merkmal des inhibitorischen Effekts der kleinen Moleküle darstellt (Tab. 3.4 und Abb. 3.37B). Sowohl aus den Aggregationskurven selbst, als auch aus den Balkendiagrammen der finalen Fluoreszenzintensitäten ist eine deutliche Unterteilung der potentiellen Inhibitormoleküle in zwei Gruppen ersichtlich. Dabei zeigt die eine Gruppe von Molekülen keinen signifikanten inhibitorischen Effekt (Abb. 3.37, oberhalb der orangen Linien) und die andere, sieben Moleküle umfassende Gruppe eine konzentrationsabhängige Reduktion der I_f um mindestens 50% bezogen auf den Wert des reinen hIAPP, und damit eine reduzierte Menge an gebildeten hIAPP-Fibrillen (Abb. 3.37, unterhalb der orangen Linien). Die Verbindung anle138b, für die ein effektiver inhibitorischer Effekt gegenüber der Aggregation von PrP^{Sc} und α -Synuclein *in vitro* und *in vivo* ermittelt wurde, wies bei dieser experimentellen Anordnung in beiden verwendeten Konzentrationen keinerlei Inhibition der Aggregation des hIAPP auf. Trotzdem wurde anle138b für weitere konzentrationsabhängige Messungen ($c = 0,1-5 \mu$ M, Stocklösungen 10-500 μ M in DMSO) der zeitlichen Änderung der Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation von 10 μ M hIAPP herangezogen (Tab. 3.4, Abb. 3.38 und Abb. A.4 im Anhang), ebenso wie die sieben auf die hIAPP-Aggregation inhibierend wirkenden Moleküle.

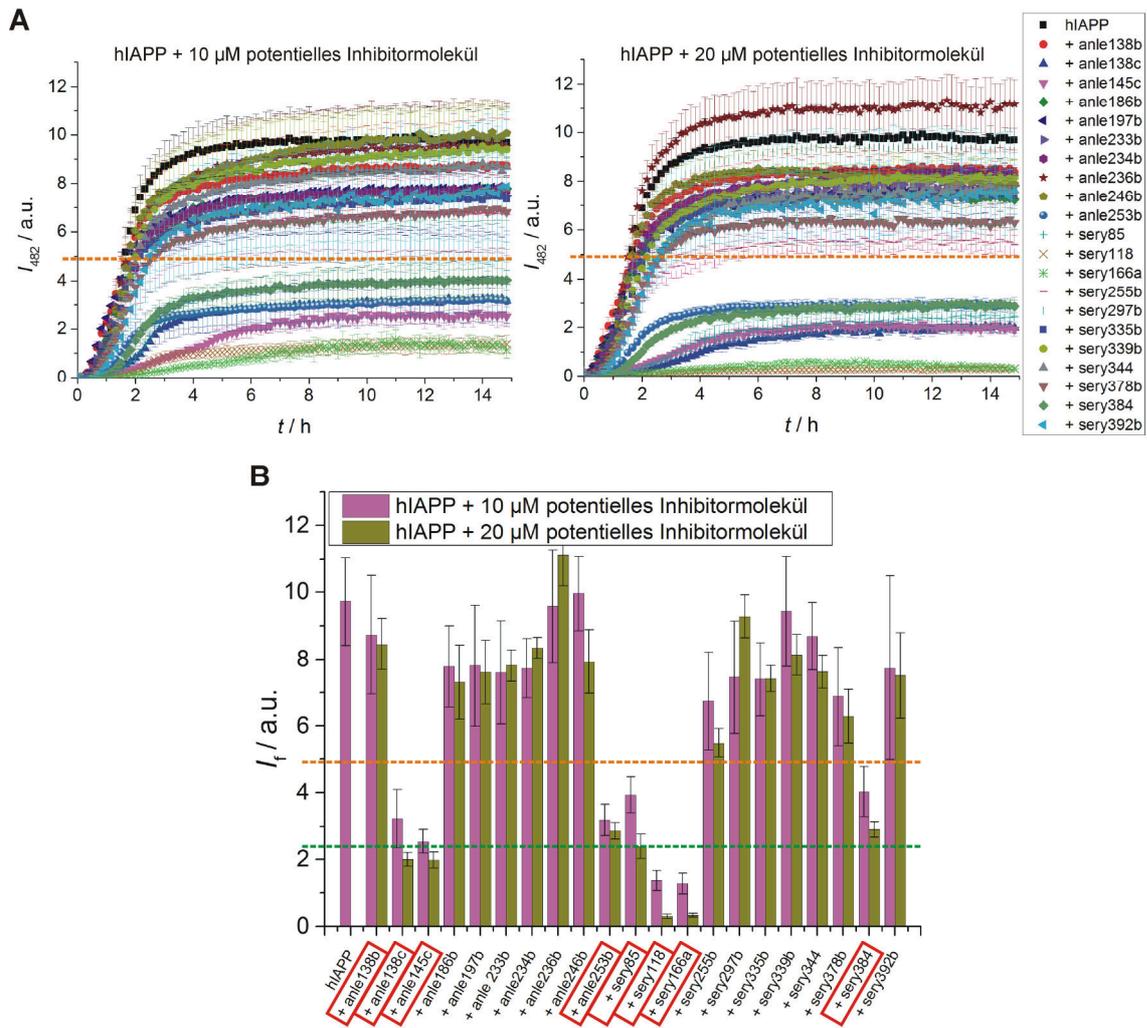


Abbildung 3.37: Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensitäten (A) und finale Fluoreszenzintensitäten (B) des ThT während der Aggregation von 10 μM hIAPP in Anwesenheit von 10 μM und 20 μM potentieller Inhibitormoleküle. Die gestrichelten Linien markieren in allen Bildern den Wert, bei dem 50% (orange) bzw. 75% (grün) Reduktion von I_f bezogen auf reines hIAPP erreicht sind. Rot umrandete Inhibitormoleküle in B wurden für weitere konzentrationsabhängige Messungen ausgewählt.

Wie zu erwarten, zeigte anle138b auch in geringeren Konzentrationen keine Inhibition der Aggregation des hIAPP. Von den sieben weiteren getesteten Molekülen zeigten vier – anle138c, anle145c, anle253b und sery166a – eine Reduktion der I_f um $\geq 50\%$, wenn sie in einer Konzentration von 5 μM gegenüber 10 μM hIAPP eingesetzt wurden. Für alle sieben konnte im äquimolaren Verhältnis zu hIAPP (je $c = 10 \mu\text{M}$) eine Verminderung des I_f -Werts um $\geq 50\%$, für zwei, namentlich sery118 und sery166a, sogar eine Reduktion um $\geq 75\%$ detektiert werden. Im doppelten Überschuss ($c = 20 \mu\text{M}$) gegenüber hIAPP zeigten alle Moleküle eine Verminderung der gebildeten hIAPP-Fibrillen um $\geq 50\%$ und fünf dieser Moleküle (anle138c, anle145c, sery85, sery118 und sery166a) eine Reduktion um $\geq 75\%$. Somit konnte der stärkste inhibitorische Effekt auf die hIAPP-Aggregation durch die Verbindungen sery118 und sery166a beobachtet werden, die beide schon in äquimolarer Konzentration zu hIAPP die Fibrillenbildung um mehr als 75% reduzierten. In beiden Fällen wurde allerdings

auch im doppelten molaren Überschuss keine vollständige Inhibition der Aggregation erzielt. Darüber hinaus zeigt auch die Verbindung anle253b eine deutliche Verringerung der Fibrillenbildung bereits bei 5 μM , aber keine weitere Verbesserung dieses Wertes bei höheren Konzentrationen. Diese stagnierende Konzentrationsabhängigkeit der inhibierenden Wirkung könnte auf die geringe Löslichkeit des anle253b in wässriger Lösung zurückzuführen sein [232]. Die im Rahmen dieser Experimente verwendeten 1% (v/v) DMSO in wässriger Pufferlösung reichen scheinbar für eine Löslichkeit der Verbindung über 5 μM nicht aus, sodass keine weitere Verringerung der Fibrillenbildung bei Zugabe höherer Konzentrationen beobachtet werden kann.

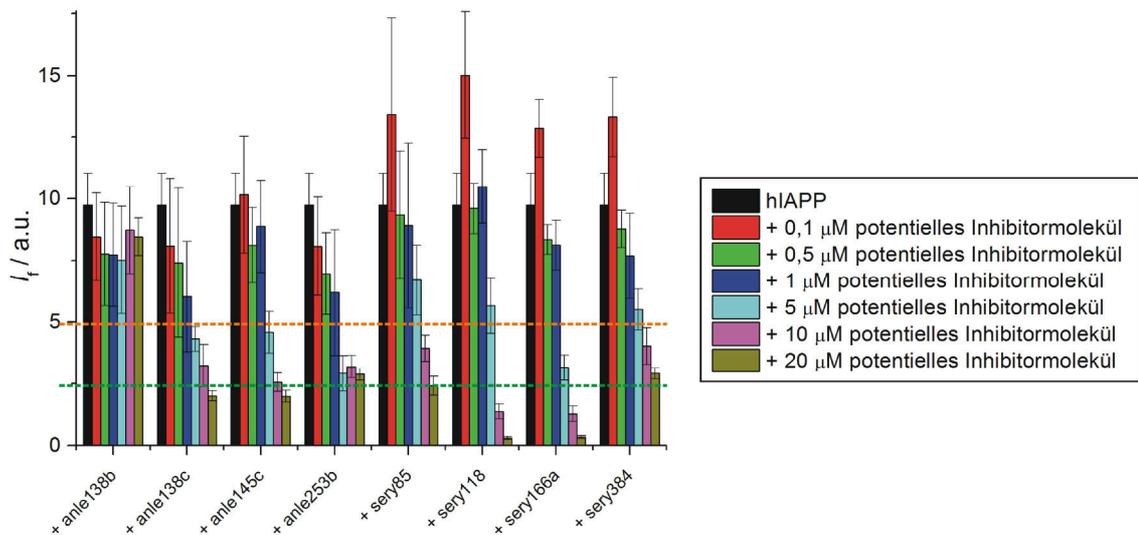
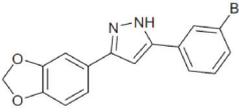
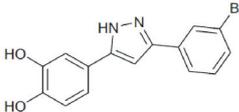
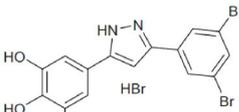
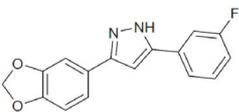
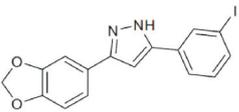
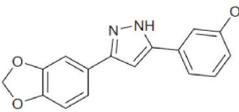


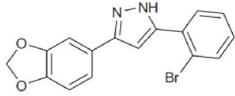
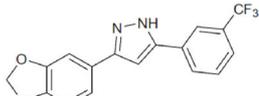
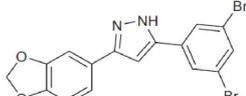
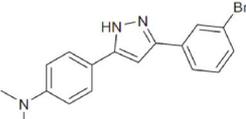
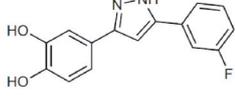
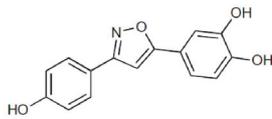
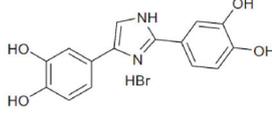
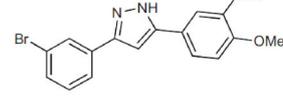
Abbildung 3.38: Finale Fluoreszenzintensitäten des ThT während der Aggregation von 10 μM hIAPP in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen (0,1-20 μM) ausgewählter potentieller Inhibitormoleküle. Die gestrichelten Linien markieren den Wert, bei dem 50% (orange) bzw. 75% (grün) Reduktion von I_f bezogen auf reines hIAPP erreicht sind.

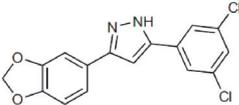
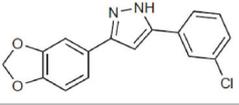
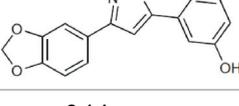
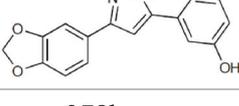
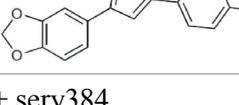
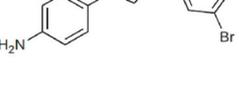
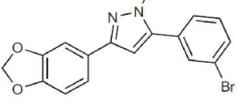
Bezüglich der Kinetik der hIAPP-Aggregation in Anwesenheit der sieben inhibierend wirkenden Moleküle (Tab. 3.4) konnte durch die beiden Verbindungen anle253b und sery384 keine signifikante Änderung, weder der Dauer der lag-Phase noch der Wachstumsrate der Fibrillen, festgestellt werden. In diesen beiden Fällen läuft die Aggregation trotz reduzierter Fibrillenbildung in kinetisch gleicher Weise wie die Aggregation des reinen hIAPP ab. Dies könnte auf die partielle Stabilisierung von gebundenen monomeren hIAPP-Spezies hindeuten, ohne dass dabei das Aggregationsverhalten des ungebundenen hIAPP beeinflusst wird. Im Fall der fünf weiteren auf die hIAPP-Aggregation inhibierend wirkenden Moleküle (anle138c, anle145c, sery85, sery118 und sery166a) kommt es ab einer Konzentration von 1 μM zu verlängerten lag-Phasen um $\geq 50\%$ bzw. bei höheren Konzentrationen auch um $\geq 75\%$. Die Wachstumsrate, k_{app} , wird lediglich durch anle138c, anle145c und sery166a ab einer Konzentration von 10 μM Inhibitormolekül um $\geq 50\%$ verlangsamt. In diesen Fällen scheinen die kleinen Moleküle die Stabilisierung oligomerer oder präfibrillärer hIAPP-Spezies zu

bewirken. Dies würde die Stagnation in der Bildung von Nukleationskeimen, beobachtet als Verlängerung der Dauer der lag-Phase, und das verlangsamte Fibrillenwachstum, detektiert als reduzierte apparente Wachstumskonstante, erklären.

Tabelle 3.4: Auswertung der Aggregationskurven des hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Anwesenheit potentieller Inhibitormoleküle ($c = 0,1\text{-}20 \mu\text{M}$) bezüglich t_{lag} , k_{app} und I_f . Zum Vergleich ist die Inhibitionsrate gegenüber der $\alpha\text{-Syn}$ - und PrP^{Sc} -Aggregation *in vitro* bzw. *in vivo* aus Ref. [232] angegeben. Veränderungen der Werte in Richtung der Inhibition um $\geq 50\%$ sind in Orange und um $\geq 75\%$ in Grün dargestellt.

potentielles Inhibitormolekül	$c / \mu\text{M}$	$t_{\text{lag}} / \text{h}$	$k_{\text{app}} / \text{h}^{-1}$	$I_f / \text{a.u.}$	Inhibition / % [232]		
					$\alpha\text{-Syn}$ <i>in vitro</i>	PrP^{Sc} <i>in vitro</i>	PrP^{Sc} <i>in vivo</i>
hIAPP		$0,9 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	$9,7 \pm 1,3$			
+ anle138b 	0,1	$0,4 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,4$	$8,4 \pm 1,8$	77	84	78, 57, 108, 70 [†]
	0,5	$0,6 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$7,8 \pm 2,1$			
	1	$0,5 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$7,7 \pm 2,1$			
	5	$0,3 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	$7,5 \pm 2,2$			
	10	$0,3 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,4$	$8,7 \pm 1,8$			
	20	$0,4 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,8$			
+ anle138c 	0,1	$0,6 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$	$8,1 \pm 2,7$	99	19	<10
	0,5	$0,9 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	$7,4 \pm 3,0$			
	1	$0,9 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$6,0 \pm 2,2$			
	5	$1,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,5$			
	10	$1,3 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,9$			
	20	$1,8 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$			
+ anle145c 	0,1	$0,9 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$	$10,2 \pm 2,4$	96	-	-
	0,5	$1,0 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$8,1 \pm 1,5$			
	1	$1,1 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,3$	$8,9 \pm 1,9$			
	5	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,8$			
	10	$1,6 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,4$			
	20	$1,4 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$			
+ anle186b 	10	$0,7 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$7,8 \pm 1,2$	<10	48	30
	20	$0,4 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$7,3 \pm 1,1$			
+ anle197b 	10	$0,4 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$7,8 \pm 1,8$	<10	16	<10
	20	$0,2 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,4$	$7,6 \pm 1,0$			
+ anle233b 	10	$0,5 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2$	$7,6 \pm 1,5$	13	-	33
	20	$0,5 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,5$			

potentielles Inhibitormolekül	c / μM	t _{lag} / h	k _{app} / h ⁻¹	I _f / a.u.	Inhibition / % [232]		
					α-Syn <i>in vitro</i>	PrP ^{Sc} <i>in vitro</i>	PrP ^{Sc} <i>in vivo</i>
+ anle234b 	10 20	0,8 ± 0,1 0,6 ± 0,2	2,2 ± 0,2 2,1 ± 0,2	7,7 ± 0,9 8,3 ± 0,3	<10	<10	<10
+ anle236b 	10 20	0,7 ± 0,2 0,8 ± 0,1	2,2 ± 0,2 2,4 ± 0,2	9,6 ± 1,7 11,1 ± 1,0	<10	<10	12
+ anle246b 	10 20	0,8 ± 0,1 0,8 ± 0,1	2,4 ± 0,2 2,5 ± 0,2	10,0 ± 1,1 7,9 ± 1,0	20	-	-
+ anle253b 	0,1 0,5 1 5 10 20	0,9 ± 0,1 0,8 ± 0,1 0,8 ± 0,1 0,7 ± 0,2 0,8 ± 0,1 0,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1 2,5 ± 0,2 2,2 ± 0,2 1,8 ± 0,1 2,4 ± 0,1 2,0 ± 0,1	8,1 ± 2,0 7,0 ± 1,7 6,2 ± 2,6 2,9 ± 0,7 3,2 ± 0,5 2,9 ± 0,2	50	80	59
+ sery85 	0,1 0,5 1 5 10 20	1,0 ± 0,1 1,0 ± 0,1 1,0 ± 0,1 1,3 ± 0,1 1,5 ± 0,1 1,6 ± 0,2	2,7 ± 0,1 2,7 ± 0,1 2,6 ± 0,1 2,3 ± 0,1 2,1 ± 0,1 1,4 ± 0,1	13,4 ± 3,9 9,3 ± 2,6 8,9 ± 3,4 6,7 ± 1,4 3,9 ± 0,5 2,4 ± 0,4	95	-	13
+ sery118 	0,1 0,5 1 5 10 20	1,1 ± 0,1 1,1 ± 0,0 1,1 ± 0,1 1,4 ± 0,1 1,6 ± 0,1 *	2,7 ± 0,2 2,9 ± 0,1 2,6 ± 0,2 2,7 ± 0,2 2,4 ± 0,2 *	15,0 ± 2,6 9,6 ± 1,0 10,5 ± 1,5 5,7 ± 1,1 1,4 ± 0,3 0,3 ± 0,1	76	-	-
+ sery166a 	0,1 0,5 1 5 10 20	1,2 ± 0,1 1,3 ± 0,0 1,4 ± 0,1 2,4 ± 0,2 2,2 ± 0,5 *	2,4 ± 0,1 3,4 ± 0,1 3,1 ± 0,2 2,3 ± 0,4 0,7 ± 0,1 *	12,8 ± 1,2 8,3 ± 0,6 8,1 ± 1,0 3,1 ± 0,5 1,3 ± 0,3 0,3 ± 0,1	100	-	<10
+ sery255b 	10 20	0,7 ± 0,2 0,4 ± 0,4	1,8 ± 0,1 1,6 ± 0,2	6,8 ± 1,5 5,5 ± 0,4	<10	-	25, <10 [†]

potentielles Inhibitormolekül	c / μM	t _{lag} / h	k _{app} / h ⁻¹	I _f / a.u.	Inhibition / % [232]		
					α-Syn <i>in vitro</i>	PrP ^{Sc} <i>in vitro</i>	PrP ^{Sc} <i>in vivo</i>
+ sery297b 	10 20	0,9 ± 0,1 0,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2 2,4 ± 0,2	7,5 ± 1,7 9,3 ± 0,6	<10	-	-
+ sery335b 	10 20	0,7 ± 0,1 0,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2 2,1 ± 0,1	7,4 ± 1,1 7,4 ± 0,4	90	52	68, 46[†]
+ sery339b 	10 20	1,0 ± 0,1 0,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1 1,9 ± 0,2	9,4 ± 1,6 8,1 ± 0,6	<10	-	37
+ sery344 	10 20	0,9 ± 0,1 0,9 ± 0,2	2,2 ± 0,1 1,5 ± 0,1	8,7 ± 1,0 7,6 ± 0,5	98	-	21
+ sery378b 	10 20	0,8 ± 0,1 0,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1 2,0 ± 0,1	6,9 ± 1,5 6,3 ± 0,8	74	34	39
+ sery384 	0,1 0,5 1 5 10 20	1,1 ± 0,1 1,1 ± 0,1 1,0 ± 0,1 1,0 ± 0,1 1,2 ± 0,1 1,1 ± 0,2	2,9 ± 0,2 2,5 ± 0,1 2,4 ± 0,1 1,9 ± 0,1 2,0 ± 0,1 1,8 ± 0,2	13,3 ± 1,6 8,8 ± 0,8 7,7 ± 1,7 5,5 ± 0,8 4,0 ± 0,7 2,9 ± 0,2	99	55	<10
+ sery392b 	10 20	1,0 ± 0,1 1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1 2,0 ± 0,1	7,7 ± 2,8 7,5 ± 1,3	<10	-	33

*Aufgrund der Abweichung der Kurven vom sigmoidalen Verlauf bzw. der vollständigen Inhibition der Aggregation ist die Auswertung der Parameter mit dem verwendeten Modell nicht sinnvoll.

†Abhängig vom Ort (Gehirn oder Milz) der Messung und Art bzw. Zeitpunkt der Gabe (Details siehe Ref. [232])

3.6.3 Zusammenfassung und Diskussion

Von den getesteten 21 potentiellen Inhibitormolekülen, die aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt wurden und die *in vitro* und/oder *in vivo* inhibierend auf die Aggregation von PrP^{Sc} und/oder α-Synuclein wirkten, zeigten im Rahmen des verwendeten ThT-Assays sieben Verbindungen auch einen inhibierenden Effekt auf die

Aggregation des hIAPP. Die Verbindung anle138b, die als potentieller pharmazeutischer Wirkstoff zur Inhibition der Bildung und Akkumulation pathologischer Oligomere des PrP^{Sc} und des α -Synucleins beschrieben wurde [232], zählte allerdings nicht zu diesen gegenüber hIAPP inhibierend wirkenden Molekülen. Dabei ist zu beachten, dass alle getesteten Verbindungen im Rahmen der durchgeführten ThT-Assays in wässriger Pufferlösung mit 1% (v/v) DMSO vorlagen, wobei nur fünf der Moleküle (anle138c, anle145c, sery85, sery118 und sery166a) eine moderate, alle anderen eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweisen [*persönliche Kommunikation mit Sergey Ryazanov, Doktorand der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Griesinger, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen*]. Aus diesem Grund könnte es im ThT-Assay zu falsch negativen Ergebnissen bezüglich der nur gering wasserlöslichen Verbindungen, zu denen auch anle138b zählt, gekommen sein. Um dies auszuschließen, beziehungsweise das inhibitorische Potential der wenig wasserlöslichen Verbindungen aufzudecken, müssten Experimente durchgeführt werden, bei denen die Moleküle beispielsweise in Lipidvesikel als Trägermaterial integriert werden. Dies könnten ebenfalls ThT-Assays der hIAPP-Aggregation unter Zugabe von zwitterionischen oder partiell negativ geladenen Vesikeln (vgl. Kapitel 3.1.3) mit integrierten potentiellen Inhibitormolekülen sein. Da die hIAPP-Aggregation in Anwesenheit von Lipidvesikeln nach der Adsorption des hIAPP an deren Oberfläche abläuft (vgl. Kapitel 3.1.4), sind die Inhibitormoleküle trotz Integration in die Vesikel für hIAPP zugänglich.

Im Rahmen der durchgeführten ThT-Assays zeigten die beiden moderat wasserlöslichen Verbindungen sery118 und sery166a die stärkste Wirkung auf die hIAPP-Aggregation. Jedoch konnte auch im doppelten molaren Überschuss keine vollständige Inhibition erreicht werden. Besonders hervorzuheben ist, dass die nur geringfügig wasserlösliche Verbindung anle253b schon bei einer zugegebenen Konzentration von 5 μ M gegenüber 10 μ M hIAPP eine Inhibition der hIAPP-Aggregation um 72% bewirkte. Dieser deutliche inhibitorische Effekt stagnierte wahrscheinlich lediglich aufgrund der geringen Löslichkeit der Verbindung bei höheren verwendeten Konzentrationen bei diesem Wert.

Bezüglich des Mechanismus der Inhibition können aufgrund der ThT-Assays nur erste vorsichtige Schlüsse gezogen werden. Die Veränderungen der Kinetiken weisen aber auf zwei unterschiedliche Inhibitionsmechanismen zur Reduktion der Menge an gebildeten hIAPP-Fibrillen hin. Hier zeigen die Verbindungen anle253b und sery384 keine signifikante Änderung der Kinetik der hIAPP-Aggregation, welches auf die partielle Stabilisierung von gebundenen monomeren hIAPP-Spezies hindeutet, ohne dass dabei das Aggregationsverhalten des ungebundenen hIAPP bezüglich der Bildung von Nukleationskeimen, Oligomeren und später fibrillären Strukturen beeinflusst wird.

Dies könnte ein effektiver Mechanismus sein, um die Bildung toxischer Oligomere des hIAPP zu verhindern. Die weiteren fünf potentiellen Inhibitoren (anle138c, anle145c, sery85, sery118 und sery166a) scheinen die Stabilisierung oligomerer oder präfibrillärer hIAPP-Spezies zu bewirken, welche die Stagnation der Bildung von Nukleationskeimen und ein verlangsamtes Fibrillenwachstum zur Folge hat. Dieser Inhibitionsmechanismus könnte insofern problematisch sein, als das hier potentiell toxische hIAPP-Oligomere stabilisiert werden könnten. Es könnte allerdings auch zur Stabilisierung nicht toxischer *off-pathway*-Spezies kommen, wie es im Fall der Stabilisierung von globulären hIAPP-Spezies durch Crowding-Substanzen beobachtet wurde (vgl. Kapitel 3.4). Dieses Verhalten sollte an Hand von Zytotoxizitätsmessungen der entstehenden hIAPP-Spezies gegenüber der pankreatischen β -Zelllinie INS-1E aufgeklärt werden.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Inhibition der Aggregation von α -Synuclein *in vitro* (Tab. 3.4), zeigen alle sieben Verbindungen, die inhibierend gegenüber der hIAPP-Fibrillenbildung wirken, auch einen inhibitorischen Effekt um mindestens 50% auf α -Synuclein. Im Umkehrschluss zeigen aber nicht alle Verbindungen, die gegenüber α -Synuclein wirken, auch eine Wirkung auf hIAPP. Eingeschlossen dem anle138b zeigen vier Verbindungen (anle138b, sery335b, sery344 und sery378b) einen inhibitorischen Effekt von $\geq 50\%$ auf α -Synuclein, die keine Wirkung auf hIAPP ausüben. Dieses könnte wiederum auf falsch negative Ergebnisse des ThT-Assays, aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit einiger Verbindungen, zurückzuführen sein. Bezüglich des Vergleichs zur Inhibition der PrP^{Sc}-Aggregation zeigten nur zwei (anle253b und sery384) Verbindungen, die die hIAPP-Aggregation inhibierten, auch eine inhibierende Wirkung gegenüber der PrP^{Sc}-Aggregation *in vitro* und nur eine, anle253b, ebenfalls eine Wirkung auf die PrP^{Sc}-Aggregation *in vivo*. Bemerkenswerterweise sind dies eben die beiden Verbindungen, die aufgrund der Vermutungen aus den ermittelten Kinetiken der hIAPP-Aggregation im ThT-Assay monomere hIAPP-Spezies stabilisieren und somit keine toxischen Oligomere entstehen lassen.

Zusammengenommen scheint vor allem die Verbindung anle253b aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung in geringer Konzentration, sowie der vermuteten Inhibition der Bildung toxischer, oligomerer hIAPP-Spezies, ein großes Potential zu besitzen, die hIAPP-Aggregation und Zytotoxizität *in vitro* und eventuell sogar *in vivo* zu inhibieren. Die durchgeführten ThT-Assays können dazu jedoch nur erste Vermutungen liefern. Um falsch negative Ergebnisse aufgrund des Problems der Wasserlöslichkeit auszuschließen, müssten alle 21 Verbindungen in weiteren Untersuchungen, z. B. unter der Verwendung von Lipidvesikeln als Trägermaterial, getestet werden. Erst dann erscheint es auch sinnvoll, Aussagen über Struktur-Wirkungsbeziehungen zu tätigen, da zum aktuellen Zeitpunkt hauptsächlich die Löslichkeit der Verbindungen in Wasser – alle fünf moderat wasserlöslichen und nur zwei weitere Verbindungen zeigen einen

inhibitorischen Effekt – eine Rolle zu spielen scheint. Darüber hinaus sollten Messungen zur Bestimmung der Toxizität der gebildeten hIAPP-Spezies sowie möglicherweise AFM- und Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der inhibierenden Wirkung auf die für hIAPP beobachtete Permeabilisierung von Lipidmembranen (vgl. Kapitel 3.1.4) durchgeführt werden. Zur weiteren Analyse des vorliegenden Inhibitionsmechanismus könnten ATR-FTIR-Messungen zur Bestimmung von Veränderungen der Sekundärstruktur des hIAPP herangezogen werden.

4

FAZIT

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss verschiedener biologisch relevanter Komponenten, wie z. B. zellulärer Lipidmembranen, physiologischer Interaktionspartner aber auch der Lösungsumgebung, auf das Aggregationsverhalten des humanen Insel-Amyloid-Polypeptids studiert. Werden dabei die Ergebnisse aller durchgeführten Studien gemeinsam betrachtet, wird deutlich, dass die Aggregation und Fibrillenbildung des hIAPP und damit einhergehend auch seine Zytotoxizität *in vivo* von einer ganzen Reihe an Faktoren abhängt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine aus pankreatischen β -Zellen isolierte Lipidmembran die Aggregation des hIAPP um ein Vielfaches beschleunigt und dass dieser Effekt nicht allein auf elektrostatische Wechselwirkungen des N-terminalen, positiv geladenen Aminosäurebereichs des hIAPP mit der partiell negativ geladenen, isolierten β -Zellmembran zurückzuführen ist. Aufgrund der Komplexität und Heterogenität dieser isolierten Zellmembran auf Einzelmolekülebene spielen auch hydrophobe Wechselwirkungen des hIAPP mit der Lipidphasengrenzfläche eine signifikante Rolle bei der hIAPP/Membran-Interaktion. Auch die Wechselwirkung des hIAPP mit anderen Peptiden und Proteinen beeinflusst seine Aggregation signifikant. In Anwesenheit des ebenfalls amyloidogenen und an Proteinablagerungserkrankungen beteiligten Peptids A β werden beispielsweise hIAPP/A β -Heteroaggregate gebildet. Diese Heteroaggregate adsorbieren an die isolierte β -Zellmembran, aggregieren dort zu Fibrillen und permeabilisieren die β -Zellmembran. Diese Prozesse erfolgen zwar im Vergleich zum reinen hIAPP deutlich langsamer, jedoch schneller als beim reinen A β . Darüber hinaus nehmen diese hIAPP/A β -Heterofibrillen die Sekundärstruktur der reinen hIAPP-Fibrillen an. Für SAP, ein Protein das häufig zusammen mit amyloiden Ablagerungen des hIAPP detektiert wird, konnte demgegenüber aus ersten Ergebnissen der hIAPP/SAP-Interaktionsstudie ein stabilisierender Einfluss auf oligomere Spezies des hIAPP identifiziert werden. Eine mögliche Rückfaltung dieser hIAPP-Oligomere in ihre native Konformation könnte möglicherweise mit der Chaperonaktivität des SAP zu erklären sein. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für das zur Simulation des Crowding in der biologischen Zelle verwendete Protein BSA bei gemeinsamer Inkubation mit hIAPP detektiert. Auch BSA, dem ebenfalls eine Aktivität als Chaperon nachgewiesen wurde, konnte oligomere hIAPP-Spezies stabilisieren und möglicherweise in die monomere

Konformation zurückfalten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass makromolekulares zellähnliches Crowding in der Lage ist, die hIAPP-Aggregation zu retardieren oder sogar zu inhibieren, indem hIAPP einerseits von globulären Proteinen (BSA und Lysozym) hauptsächlich über unspezifische Wechselwirkungen gebunden wird und andererseits durch Polymer-Crowder (Ficoll und Dextran) in kleinen Kavitäten aufgrund des ausgeschlossenen Volumens stabilisiert wird. Dabei konnten die stabilisierten globulären hIAPP-Spezies als nicht toxische, *off-pathway*-Spezies identifiziert werden. Mit Hilfe von Osmolyten ist die biologische Zelle durch Änderung des intrazellulären Milieus fähig, nicht nur die Stabilität, sondern auch die Reaktivität und das Aggregationsverhalten von Peptiden und Proteinen feinstufig abzustimmen. Für hIAPP wurden gegensätzliche Effekte stabilisierender (TMAO und Betain) und destabilisierender (Harnstoff) Kosolvenzien ermittelt, wobei TMAO und weniger ausgeprägt auch Betain oligomere und präfibrilläre hIAPP-Strukturen zu stabilisieren scheinen und damit die Elongation der hIAPP-Fibrillen verlangsamen. Dagegen stabilisierte Harnstoff frühe oligomere Spezies und verhinderte die Bildung von Nukleationskeimen. Im Gemisch wurde dann eine Kompensation des Harnstoffeffektes durch TMAO gegenüber hIAPP beobachtet. Zum Abschluss wurde ein Projekt in Richtung der Entwicklung potentieller therapeutischer Wirkstoffe zur Inhibition der zytotoxischen Aggregation des hIAPP bearbeitet. Es wurden kleine organische Moleküle, die eine inhibitorische Wirkung auf die Aggregation und Toxizität der amyloidogenen Proteine PrP^{Sc} sowie α -Synuclein *in vitro* und *in vivo* gezeigt haben, auch gegenüber ihrer Wirksamkeit zur Inhibition der Aggregation des hIAPP getestet. Erste Ergebnisse dieser Studie zeigten ein inhibitorisches Potential bei sieben der 21 getesteten Verbindungen, wobei eine besonders hervorstach, da sie die Aggregation des hIAPP schon bei geringer Konzentration signifikant inhibierte.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass hIAPP in der biologischen Zelle einer Reihe von Wechselwirkungen in Form von zellulären Membranen, Interaktionsproteinen oder -peptiden sowie selbst dem natürlichen zellulären Crowding oder Osmolyten ausgesetzt ist und somit auch das Aggregationsverhalten des hIAPP von all diesen Faktoren abhängig ist. Die Parameter beeinflussen die Aggregation des hIAPP auf unterschiedliche Art und in unterschiedliche Richtungen. So wirken einige zelluläre Proteine, wie hier am Beispiel von SAP und BSA gezeigt, möglicherweise als Chaperone der hIAPP-Faltung und retardieren oder inhibieren die Aggregation. Andere Faktoren, wie beispielsweise Kosolvenzien oder makromolekulares Crowding, stabilisieren jeweils unterschiedliche hIAPP-Spezies, welches die Aggregation ebenfalls retardieren kann. Gerade diese Stabilisierung verschiedener hIAPP-Formen kann zur Akkumulation nicht toxischer *off-pathway*-Spezies, wie im Fall des Crowdings, möglicherweise aber auch zur Anhäufung toxischer hIAPP-Oligomere führen. Demgegenüber stehen zelluläre Membranen die durch Adsorption des hIAPP und damit

Erhöhung der lokalen Peptidkonzentration die Aggregation des hIAPP beschleunigen. Des Weiteren stellen sie durch ihre Permeabilisierung den Angriffspunkt des hIAPP und damit möglicherweise die Ursache der Zytotoxizität dar. Mit Hilfe der durchgeführten Projekte konnten in dieser Arbeit somit weitere wichtige und detaillierte Einblicke in das Aggregationsverhalten von hIAPP unter separatem Einfluss einzelner zellulärer Komponenten erlangt werden. Es wurde aber ebenfalls deutlich, dass das natürliche Aggregationsverhalten des hIAPP *in vivo* in seinem gesamten Ausmaß nur schwer mittels *in vitro*-Studien zu bestimmen ist. Um ein gesamtheitliches Bild zu erlangen, müssen zusätzlich Studien *in cellulo* und *in vivo*, wo all diese Faktoren gleichzeitig auf die Aggregation einwirken, herangezogen werden. Gemeinsam können diese Arten von Studien – *in vitro*, *in cellulo* und *in vivo* – helfen auf dem Weg der Entwicklung potentieller Therapien gegen Typ II Diabetes mellitus voranzuschreiten.

ANHANG

A.1 Weitere Abbildungen und Tabellen

A.1.1 Bandenanpassung der Amid-I'-Banden des hIAPP

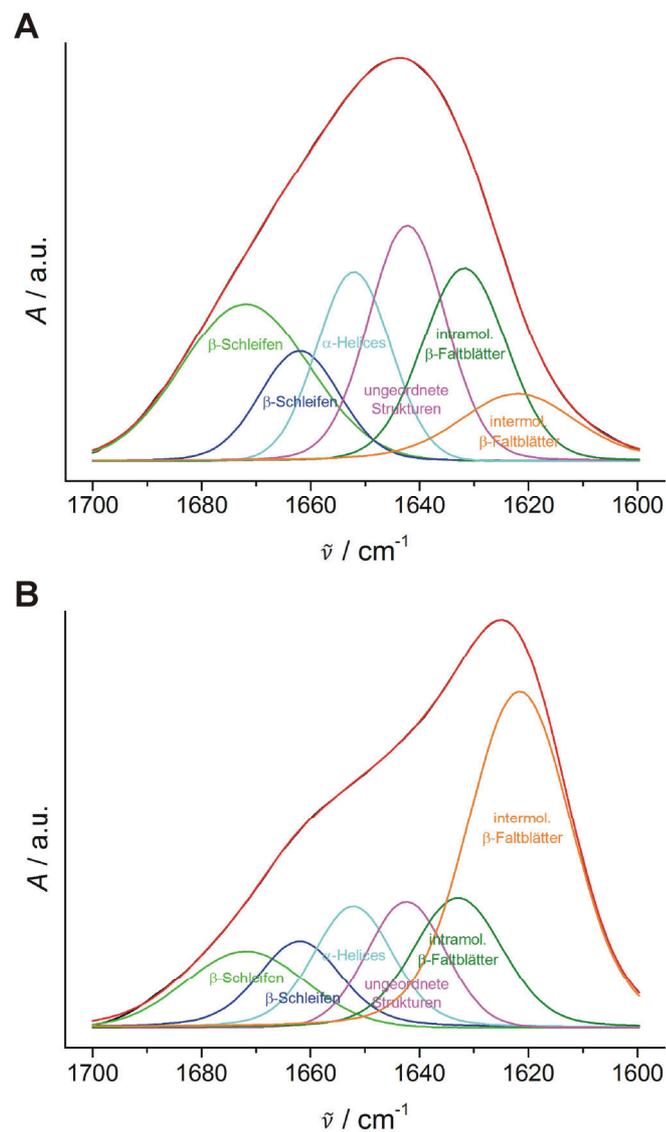
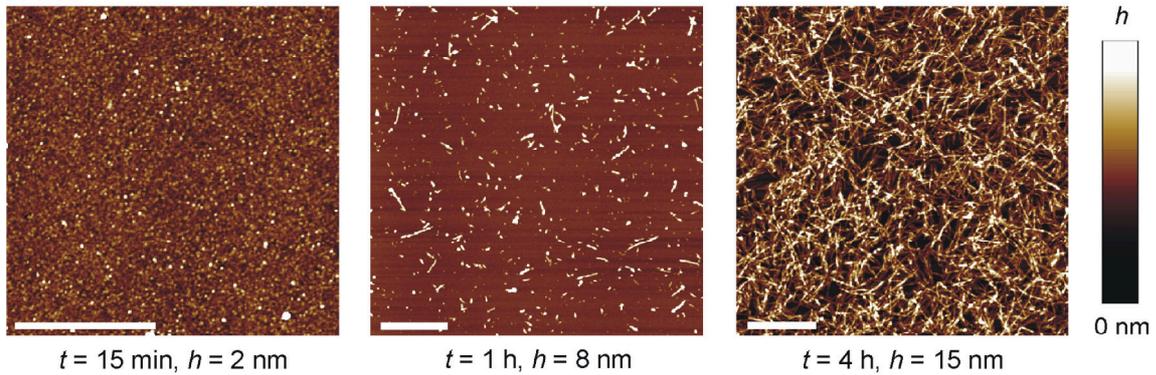


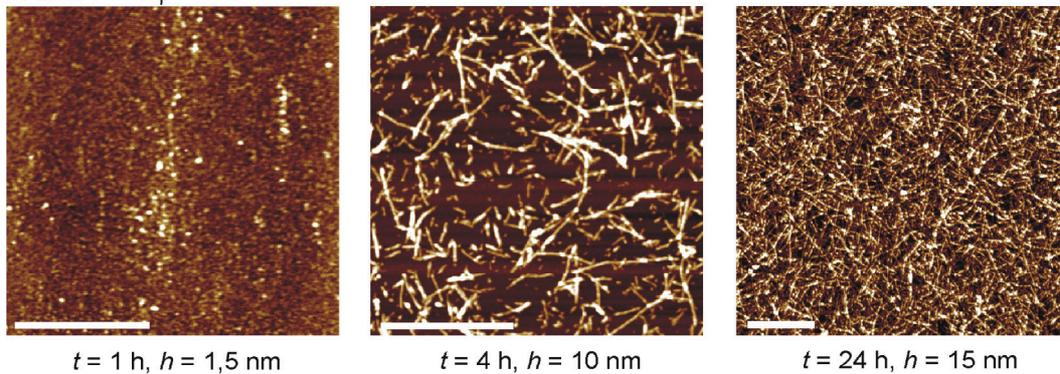
Abbildung A.1: Repräsentative Darstellung der Bandenanpassung zweier flächennormierter Amid-I'-Banden des hIAPP ($c = 3 \mu\text{M}$) während der Inkubation an einer Membran der isolierten β -Zellmembranlipide zu Beginn bei $t = 5 \text{ min}$ (**A**) und nach abgeschlossener Aggregation bei $t = 40 \text{ h}$ (**B**).

A.1.2 AFM-Aufnahmen von hIAPP und A β

A hIAPP



B hIAPP + A β



C A β

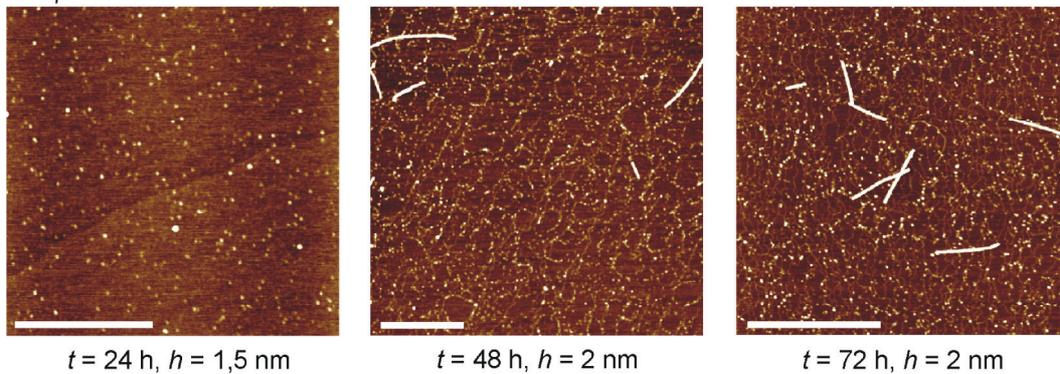
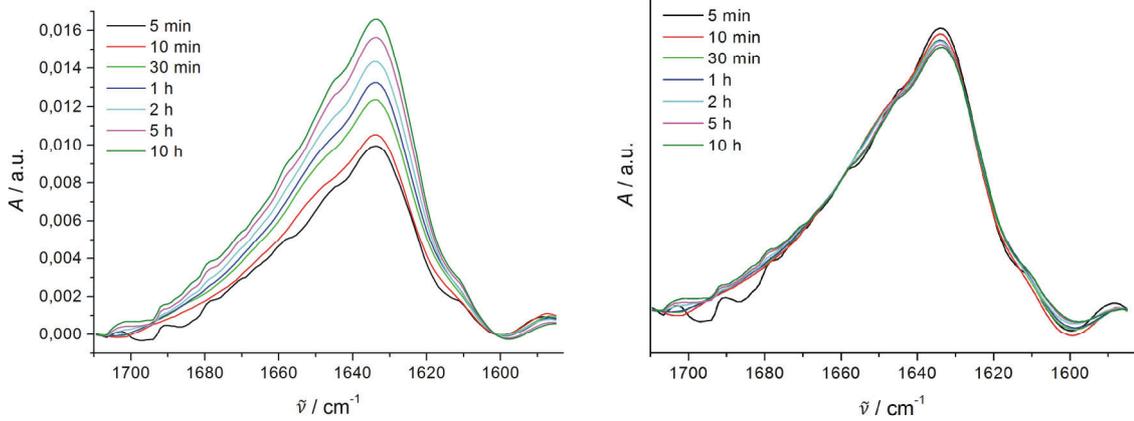


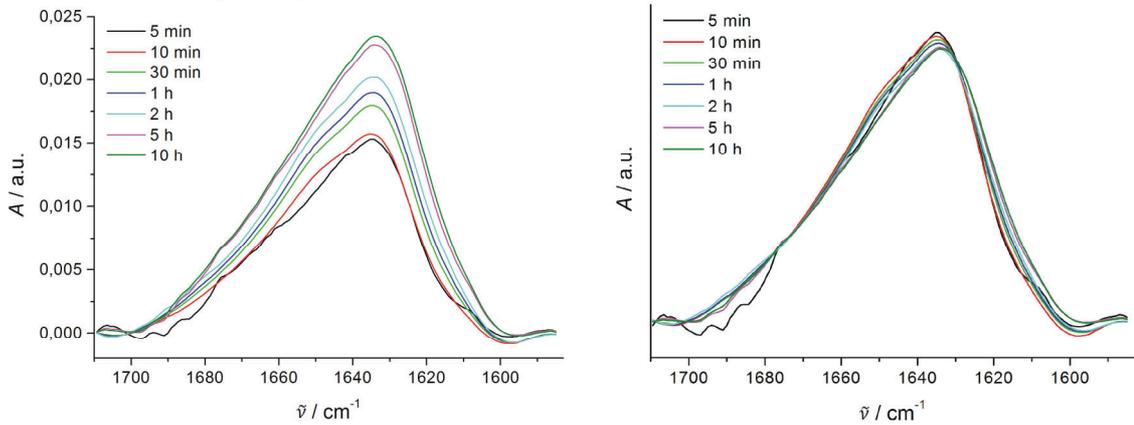
Abbildung A.2: AFM-Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aggregation von $3 \mu\text{M}$ hIAPP (A), je $3 \mu\text{M}$ hIAPP + A β (B) und $3 \mu\text{M}$ A β (C) in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4) auf Glimmer bei Raumtemperatur. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils $1 \mu\text{m}$. Nachdruck aus Ref. [138].

A.1.3 ATR-FTIR-Spektren des SAP und von hIAPP/SAP-Mischungen

A SAP



B hIAPP + SAP (10:10)



C hIAPP + SAP (10:5)

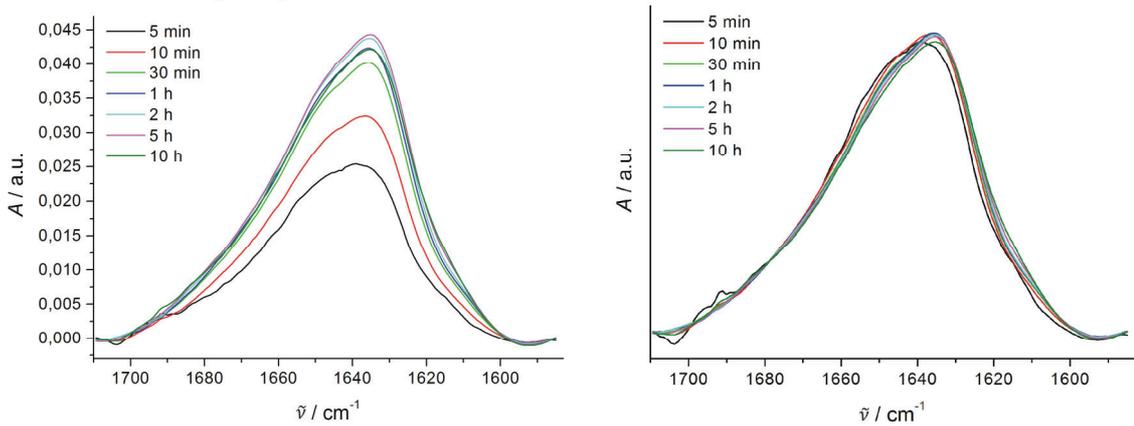


Abbildung A.3: Primäre (links) und flächennormierte (rechts) ATR-FTIR-Spektren der zeitabhängigen Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von 10 μM SAP allein (A) und einer Mischung aus 10 μM hIAPP und 10 μM SAP (B) sowie 10 μM hIAPP und 5 μM SAP (C).

A.1.4 Diffusionskonstanten und AFM-Ergebnisse des hIAPP im Crowding

Tabelle A.1: Abhängigkeit der lateralen Diffusionskonstante, D , des rIAPP-K-BODIPY FL ($c = 10 \mu\text{M}$) von der Konzentration der Crowder Ficoll, Dextran, BSA und Lysozym (je $10 \mu\text{M}$ bis 40% (w/v)) gemessen mittels FCS (Nachdruck aus Ref. [198])

	$D / \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$
rIAPP-K-BODIPY FL	$138,4 \pm 9,5$
+ 10 μM Ficoll (0,07% Ficoll)	$104,0 \pm 3,5$
+ 10% Ficoll	$51,4 \pm 0,2$
+ 20% Ficoll	$25,2 \pm 2,0$
+ 30% Ficoll	$8,7 \pm 1,3$
+ 40% Ficoll	$2,9 \pm 0,3$
+ 10 μM Dextran (0,07% Dextran)	$98,6 \pm 6,0$
+ 10% Dextran	$40,3 \pm 4,0$
+ 20% Dextran	$23,8 \pm 0,3$
+ 30% Dextran	$9,8 \pm 1,4$
+ 40% Dextran	$3,8 \pm 0,4$
+ 10 μM BSA (0,066% BSA)	$86,5 \pm 5,9$
+ 10% BSA	$30,1 \pm 8,2$
+ 20% BSA	$16,6 \pm 0,3$
+ 30% BSA	$4,9 \pm 1,1$
+ 40% BSA	$2,4 \pm 0,3$
+ 10 μM Lysozym (0,014% Lysozym)	$103,0 \pm 5,2$
+ 10% Lysozym	$29,8 \pm 2,2$
+ 20% Lysozym	$14,5 \pm 2,5$

Tabelle A.2: Höhe der mittels AFM detektierten hIAPP-Fibrillen und Oligomere (Nachdruck aus Ref. [198])

	Höhe der Fibrillen / nm	Höhe großer Oligomere / nm	Höhe kleiner Oligomere / nm
hIAPP	$5,8 \pm 2,7$	n.d.*	n.d.*
+ 20% Ficoll	$5,8 \pm 2,2$	n.d.*	n.d.*
+ 40% Ficoll	$5,3 \pm 2,2$	n.d.*	n.d.*
+ 20% Dextran	$5,7 \pm 2,0$	n.d.*	n.d.*
+ 40% Dextran	$5,5 \pm 2,3$	n.d.*	n.d.*
+ 20% BSA	$5,2 \pm 1,0$	n.d.*	$0,8 \pm 0,4$
+ 40% BSA	n.d.*	$4,4 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,5$
+ 20% Lysozym	$6,1 \pm 2,0$	$4,9 \pm 1,3$	$0,7 \pm 0,5$

*Spezies nicht detektiert

A.1.5 AFM-Ergebnisse zum Einfluss von Kosolvenzien auf hIAPP

Tabelle A.3: Höhe der mittels AFM detektierten hIAPP-Fibrillen (Nachdruck aus Ref. [219])

	Höhe der Fibrillen / nm
hIAPP	$5,6 \pm 1,8$
+ 1 M TMAO	$6,2 \pm 2,2$
+ 2 M ^{13}C -Harnstoff	$7,7 \pm 3,1$
+ 1 M TMAO + 2 M ^{13}C -Harnstoff	$6,1 \pm 2,0$

A.1.6 ThT-Diagramme der hIAPP/Inhibitor-Studien

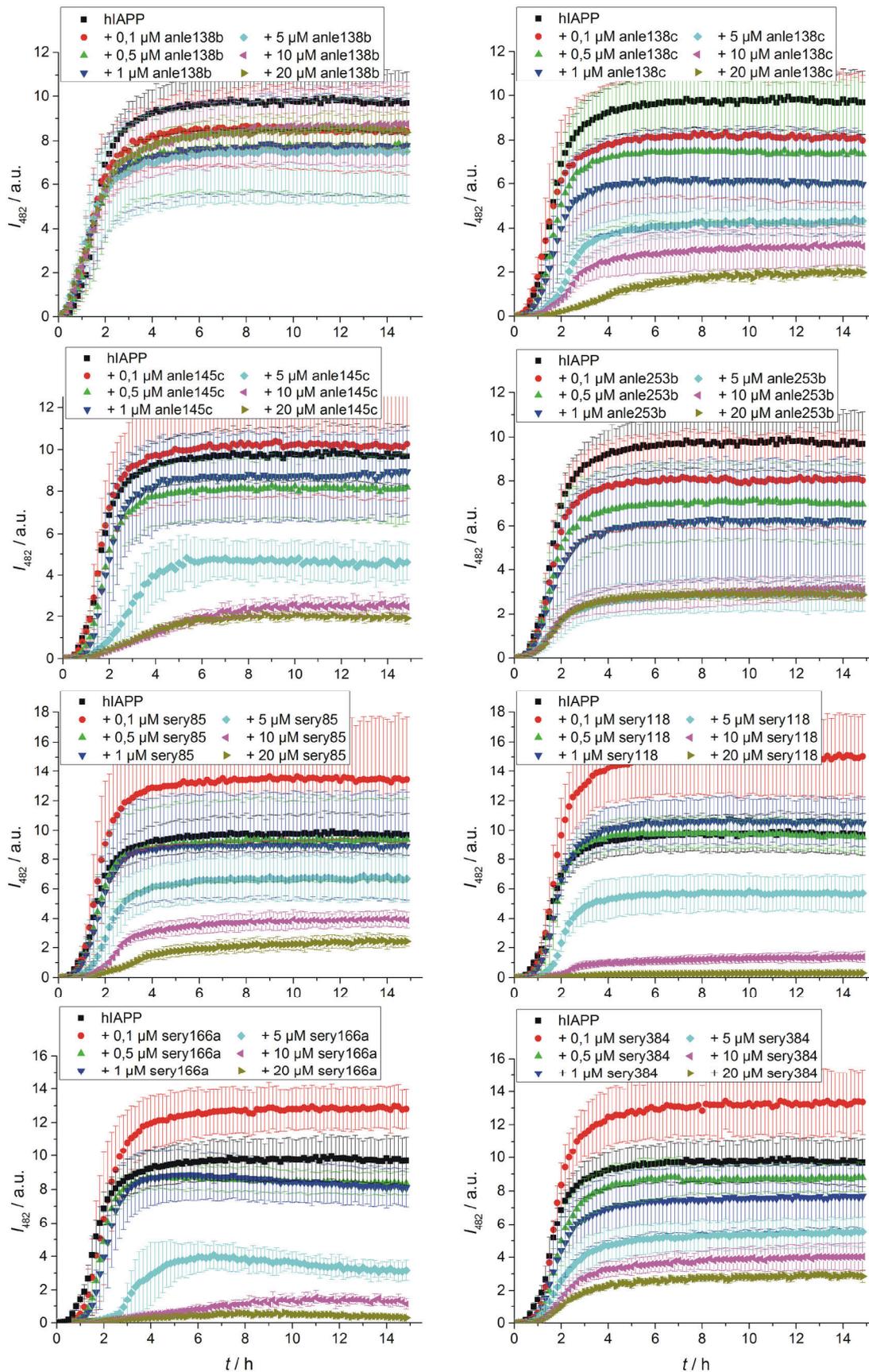


Abbildung A.4: Zeitabhängige relative Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation von 10 μM hIAPP in Anwesenheit verschiedener Inhibitormoleküle in unterschiedlichen Konzentrationen.

A.2 IAPP-unabhängige Studie: Interaktion von Ras-Proteinen mit isolierten Plasmamembranlipiden

Hintergrund, Motivation und Zielsetzung

Die Wechselwirkung von Lipiden und Proteinen an zellulären Membranen spielt eine entscheidende Rolle bei vielen biologischen Prozessen, wie dem Membrantransport, der Membranfusion oder der Signalweiterleitung. Dabei ist die laterale Organisation dieser Prozesse *in vivo*, die Bildung transienter, dynamischer Lipiddomänen (vgl. Kapitel 1.4.2) und die Beziehung dieser zu konformationellen und funktionellen Eigenschaften membranassoziierter Proteine eine offene, kontrovers diskutierte Fragestellung [94–97]. Ras-Proteine bilden eine Gruppe solcher membranassoziierter Signaleproteine, die als GTPasen in ihrer aktiven, Guanosin triphosphat-(GTP)-gebundenen Form eine Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden, hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Zellwachstum, auslösen [240–242]. Fehlregulierte, permanent aktive Ras-Proteine tragen aufgrund dessen zur Ausbildung von etwa 30% der menschlichen Krebserkrankungen bei [243]. Eine Voraussetzung für die korrekte Regulation der Signalweiterleitung von Membranrezeptoren zu intrazellulären Signalkaskaden ist die Verankerung des Ras-Proteins in der zytosolischen Seite zellulärer Lipiddoppelschichten [244,245].

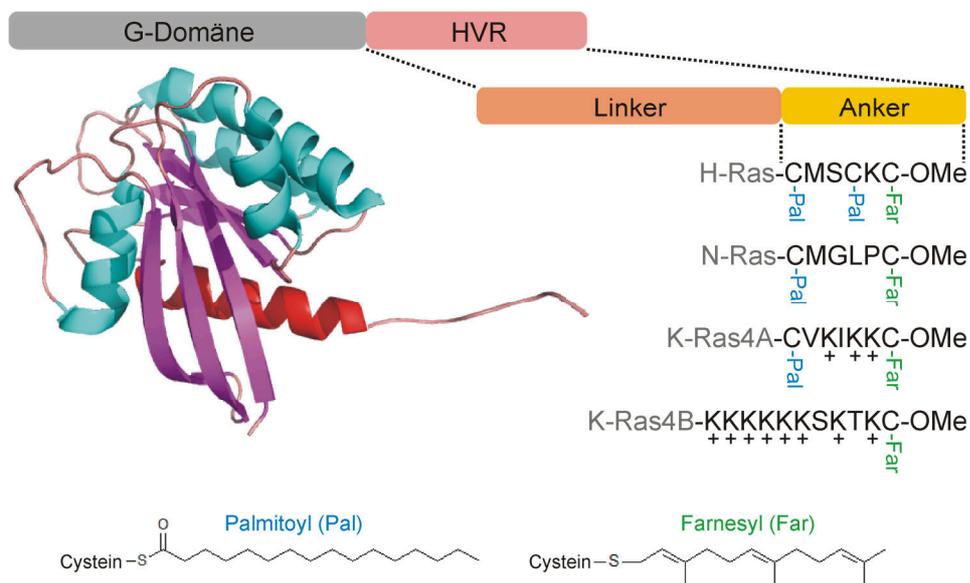


Abbildung A.5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur und der spezifischen Membrananker der Ras-Isoformen. Als Beispiel einer G-Domäne ist die des K-Ras4B, übernommen aus dem PDB Eintrag 3gft, dargestellt. Der C-terminale hypervariable Bereich (*hypervariable region*, HVR) der Proteine besteht aus dem Linker und dem isoformspezifischen Membrananker. Dieser enthält jeweils einen farnesylierten und carboxymethylierten Cysteinrest sowie entweder einen bis zwei weitere palmitoylierte Cysteinreste (H-, N- und K-Ras4A) oder eine polybasische Region von Lysinresten (K-Ras4B).

Die drei Ras-Isoformen H-, N- und K-Ras besitzen dazu spezifische posttranslationale Lipidmodifikationen ihrer C-Termini, die zusammen mit der Linkerdomäne den hypervariablen Bereich (*hypervariable region*, HVR) der Ras-Proteine bilden. Der Membrananker aller Ras-Isoformen besteht zum einen aus einem C-terminalen, farnesylierten (Far) und carboxymethylierten Cysteinrest. H-, N- und K-Ras4A enthalten darüber hinaus einen oder zwei weitere palmitoylierte (Pal) Cysteinreste, wohingegen K-Ras4B über eine polybasische Region von sechs aufeinanderfolgenden und insgesamt acht Lysinresten verfügt (Abb. A.5). Es wird angenommen, dass diese Lipidanker, von denen die Farnesylierung eine stabile und die Palmitoylierung eine reversible Modifikation darstellt, durch die Vermittlung von Protein/Protein- und Protein/Lipid-Interaktionen eine wichtige Rolle in der regulatorischen Funktion der Ras-Proteine ausüben [246,247]. Die hoch konservierte N-terminale G-Domäne der Ras-Proteine beinhaltet die Bindungsdomänen für Aktivator- und Effektorproteine [248].

Eine weitere wichtige Rolle in der Regulation der Signalvermittlung durch Ras-Proteine scheint der direkten Lipidumgebung, beispielsweise in der Ausbildung von *lipid rafts*, zuzukommen [249–255]. Im Allgemeinen wird angenommen, dass diese *raft*-Domänen als Signalplattformen dienen, die extrazelluläre Effekte mit intrazellulären Signalkaskaden verbinden [256,257]. Darüber hinaus scheint auch die Grenzfläche zwischen den Lipiddomänen eine wichtige Funktion zu besitzen [258,259]. Für N-Ras konnte in diesem Zusammenhang an einer neutralen *raft*-Modellmembran zunächst die bevorzugte Einlagerung in die flüssig-ungeordnete l_d -Phase der Membran, gefolgt von einer Diffusion in die l_o/l_d -Phasengrenze, beobachtet werden. Unabhängig vom Lipidierungsmuster und Aktivitätsstatus zeigten monofarnesyliertes sowie dilipidiertes (HD/Far, Hexadecylgruppe (HD) als nicht hydrolysierbares Analogon zur Palmitoylgruppe), und Guanosindiphosphat-(GDP)- sowie GTP-gebundenes N-Ras dieses Verhalten. Das monofarnesylierte N-Ras entspricht dabei der depalmitoylierten Form des nativen N-Ras im Zuge des Acylierungs/Deacylierungskreislaufs. Die beobachtete Einlagerung in die l_o/l_d -Phasengrenze konnte auch bei der Verwendung von viralen Membranlipiden als Modellsystem beobachtet werden. Den Grund für diese Akkumulation des N-Ras an der Lipidphasengrenze könnte dabei die Herabsetzung der Grenzflächenenergie bzw. der Grenzflächenspannung ausmachen, die somit nicht nur für die Größe und Dynamik von *raft*-Domänen, sondern auch für ihre Funktion als Signalplattformen verantwortlich zu sein scheint [249,254]. Eine vergleichbare Untersuchung wurde mit K-Ras4B an neutralen und negativ geladenen *raft*-Modellmembranen durchgeführt. Im Gegensatz zum Verhalten des N-Ras wurde die Bildung neuer Domänen bestehend aus akkumulierten Proteinen innerhalb der fluiden l_d -Phase der Membran für GDP- und GTP-gebundenes K-Ras4B detektiert. Bemerkenswerterweise wurde diese Bildung von Proteindomänen sowohl in der neutralen als auch in der anionischen *raft*-Modellmembran beobachtet, sodass dieses

Verhalten nicht ausschließlich auf elektrostatische Wechselwirkungen des polybasischen Bereichs des K-Ras4B mit den anionischen Lipiden zurückgeführt werden kann [255].

Die beschriebenen Studien wurden an *raft*-Modellmembranen, bestehend aus drei bis fünf Lipidkomponenten, und teilweise an Membranen aus viralen Lipiden durchgeführt. Die eukaryotische Plasmamembran, an der die Signalweiterleitung durch Ras-Proteine *in vivo* abläuft, ist allerdings deutlich komplexer aufgebaut. Um die Ras/Membran-Wechselwirkung an einem Lipidsystem, das der zellulären Plasmamembran sowohl in seiner Komplexität als auch in der Zusammensetzung der enthaltenen Lipide möglichst nahe kommt, zu untersuchen, wurden sogenannte *giant plasma membrane vesicles* (GPMV) der Zelllinie RBL-2H3 isoliert und verwendet. Bereits im Jahr 1976 wurde die damals neue Technik der *Plasma Membrane Vesiculation* zur direkten Isolation der Plasmamembran adhärent wachsender Zellen von SCOTT beschrieben [260]. Bei diesem Verfahren spalten die Zellen nach der Behandlung mit Aldehyden, vor allem Formaldehyd, und Disulfidbrücken reduzierenden Reagenzien, z. B. Dithiothreitol (DTT), spontan Plasmamembranvesikel in das umgebende Medium ab. Diese abgespaltenen Vesikel, die aufgrund ihrer Größe von bis zu 10 µm als *giant plasma membrane vesicles* bezeichnet werden, enthalten in ihrer Lipiddoppelschicht integriert viele native Membranproteine, aber weder Zellkompartimente noch Teile des Zytoskeletts im Inneren der GPMV und weisen außerdem Unilamellarität auf [261]. Dies macht sie zu idealen Modellsystemen der zellulären Plasmamembran. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die GPMV Phasenseparation ihrer Lipide in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen der Zellen und von den verwendeten Reagenzien zur Auslösung der Vesikelabspaltung aufweisen [92,262–265]. Um auch die Interaktion der Ras-Proteine mit reinen Lipiden der Plasmamembran ohne die Anwesenheit von weiteren Membranproteinen untersuchen zu können, wurden außerdem die Lipide der GPMV extrahiert. Im Anschluss an eine Charakterisierung der beiden isolierten Lipidsysteme – GPMV und GPMV-Lipidextrakte – bezüglich ihres Phasenverhaltens unter variierendem Temperatureinfluss mittels AFM, Fluoreszenzmikroskopie und FTIR-Spektroskopie, kann somit das spezifische Partitionierungsverhalten, welches für die unterschiedlichen Ras-Isoformen an *raft*-Modellmembranen detektiert wurde [254,255], auch an diesen komplexen plasmamembranähnlichen Lipidsystemen untersucht werden.

Experimentelle Durchführung

Der Prozess der GPMV-Gewinnung ist schematisch in Abbildung A.6 dargestellt. Zur Isolation der GPMV wurde die Zelllinie RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia*, DSMZ-Nr.: ACC 312, ATCC®-Nr.: CRL-2256) verwendet, die kommerziell vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

bezogen wurde. Sie wurde durch Subklonierung aus der Mutterzelllinie RBL-1, die aus basophilen Tumorzellen der Wistar-Ratte stammt, isoliert [266,267]. Die adhären wachsende Zelllinie RBL-2H3 vereint Charakteristika von Basophilen und Mast-Zellen [267]. Ihre normale Kultivierung erfolgte in komplexem Medium bestehend aus dem Grundmedium MEM (+ 2 mM L-Glutamin, Gibco[®], Life Technologies Inc.), welches mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (PAA, GE Healthcare Inc.), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (beides AppliChem GmbH) ergänzt wurde. Die Passage der Zellen mit einer 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco[®], Life Technologies Inc.) erfolgte zweimal pro Woche jeweils bei einer Konfluenz von etwa 80%. Mit einer Aussaatdichte von $0,375 \cdot 10^6$ Zellen pro 75 cm^2 Kulturflasche ($5 \cdot 10^3$ Zellen/ cm^2) bei anschließender Inkubation für vier Tage bzw. von $0,75 \cdot 10^6$ Zellen pro 75 cm^2 Kulturflasche (10^4 Zellen/ cm^2) bei anschließender Inkubation für drei Tage wurden 25 mL frisches Medium in 75 cm^2 Kulturflaschen (*cell culture flask, tissue-culture treated polystyrene, canted neck, plug-seal cap*, BD Falcon[™]) angeimpft. Die Kultivierung der Zellen erfolgte jeweils unter befeuchteter, 5% CO₂-haltiger Luft bei 37 °C in einem Inkubationsschrank (HERAcell 150, Thermo Fisher Scientific Inc.).

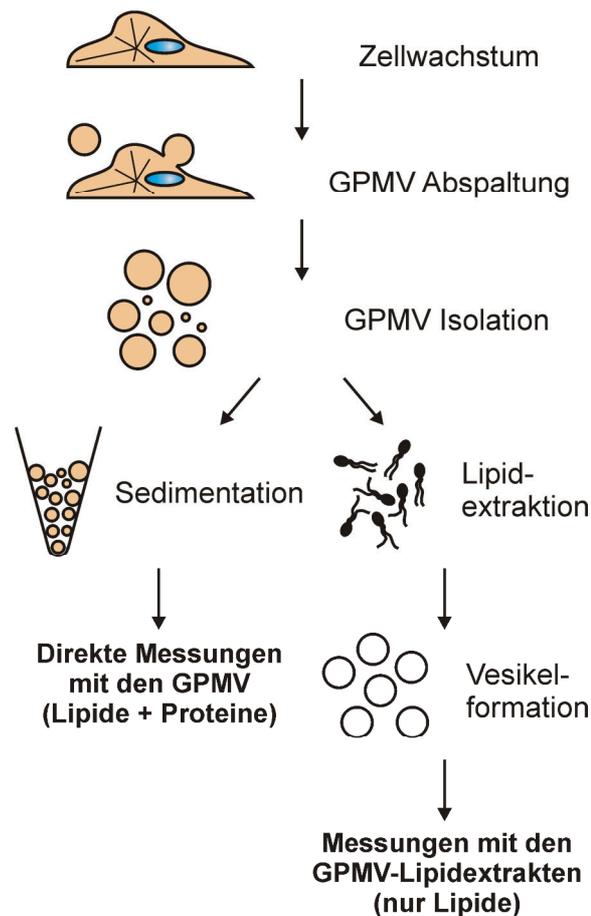


Abbildung A.6: Schematische Darstellung des Prozesses der GPMV-Gewinnung.

Um GPMV, die Phasenkoexistenz bei Raumtemperatur aufweisen, aus diesen Zellen isolieren zu können, mussten die Zellen zunächst unter speziellen Bedingungen

kultiviert werden. Dazu wurden die RBL-2H3-Zellen nach 3-tägigem Wachstum unter normalen Kulturbedingungen (siehe oben) passagiert und mit einer höheren Aussaatdichte von 10^6 Zellen pro 75 cm^2 Zellkulturflasche ($1,3 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2) in 25 mL frisches Kulturmedium, bestehend aus dem Grundmedium MEM (ohne L-Glutamin, Gibco[®], Life Technologies Inc.) ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/mL Penicillin und 100 $\mu\text{g/mL}$ Streptomycin, ausgesät. Nach fünftägiger Inkubation wurden die Zellen zunächst zweimal mit jeweils 15 mL GPMV-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7,4) gewaschen, anschließend mit 3 mL GPMV-Reagenz (25 mM Formaldehyd, 3 mM DTT in GPMV-Puffer) überschichtet und für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln (60 rpm) inkubiert. Zur Herstellung des GPMV-Reagenzes wurde Paraformaldehyd verwendet, welches durch Erhitzen im GPMV-Puffer zu Formaldehyd depolymerisiert wurde. Der Überstand über den adhären den Zellen, der nach der Inkubation die GPMV enthielt, wurde gesammelt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Im Fall der direkten Verwendung der GPMV für weitere Messungen wurden diese zunächst durch Sedimentation für 2 h bei 4°C und anschließende Entnahme der unteren 20% der Lösung aufkonzentriert. Die erhaltene GPMV-Lösung wurde weiterhin bis zur Verwendung auf Eis oder bei 4°C gelagert. Zur Isolation der reinen Lipide aus den GPMV wurde direkt im Anschluss an die GPMV-Gewinnung ohne vorherige Sedimentation eine Chloroform/Methanol-Extraktion, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Charakterisierung der GPMV und GPMV-Lipidextrakte bezüglich ihres Lipid- und Proteingehaltes sowie ihrer Lipidzusammensetzung erfolgte wie in den Kapiteln 2.2.1.2 - 2.2.1.4 beschrieben.

Zur Herstellung von GUV aus den GPMV-Lipidextrakten zur Verwendung in fluoreszenzmikroskopischen Messungen (vgl. Kapitel 2.6.2) wurde die Methode der schonenden Hydratisierung angewendet. Bei dieser Methode wird zunächst ein sehr dünner Lipidfilm auf einer Glasoberfläche erzeugt, der anschließend mit einem feuchten Stickstoffstrom vorhydratisiert wird. Es wird angenommen, dass durch diese schonende Vorhydratisierung eine Separation der einzelnen Lipidschichten des Lipidfilms erfolgt, sodass sich bei der anschließenden vollständigen Hydratisierung durch Pufferzugabe, bei einer Temperatur über der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide, leichter Lipidschichten ablösen und unilamellare Vesikel bilden können [109]. Die GUV aus den GPMV-Lipidextrakten wurden direkt in der Fluoreszenzmesszelle erstellt. Dazu wurde eine 2 mg/mL Lipidlösung in Chloroform hergestellt, die je nach weiterer Verwendung zusätzlich entweder 0,2 mol% *N*-Rh-DHPE oder jeweils 0,2 mol% der fluoreszenzmarkierten Lipide *N*-Rh-DHPE und NBD-DHPE (*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, Molecular Probes[®], Life Technologies Inc., Stocklösungen je $c = 1 \text{ mM}$ in Methanol) enthielt. Diese beiden

fluoreszenzmarkierten Lipide wurden verwendet, um die Phasenkoexistenz dieser GUV aus den GPMV-Lipidextrakten sichtbar zu machen, da NBD-DHPE bevorzugt in die flüssig-geordnete Lipidphase (l_o -Phase) von Lipidsystemen mit Phasenkoexistenz partitioniert, wohingegen *N*-Rh-DHPE die flüssig-ungeordnete Lipidphase (l_d -Phase) bevorzugt. Ein Aliquot der Lösung (20 μ L) wurde auf einem unbeschichteten Deckglas mittels *Spin-Coating* bei 800 rpm für 1 min gespreitet und für mindestens 2 h im Vakuum getrocknet. Dieses mit Lipiden beschichtete sowie ein weiteres Deckglas ohne Lipidbeschichtung wurden in die Fluoreszenzmesszelle eingebaut. Anschließend wurde ein durch Milli-Q-H₂O geleiteter Stickstoffstrom für 15 min zur Vorhydratisierung der Lipidschicht durch die Messzelle geleitet, bevor diese mit dem entsprechenden Puffer befüllt und auf 45 °C temperiert wurde. Nach Inkubation der Messzelle über Nacht bei 45 °C wurde die Temperatur langsam (1 °C/min) auf Raumtemperatur reduziert. Die so erhaltenen Vesikel konnten nun für temperaturabhängige Untersuchungen der isolierten GPMV-Lipidextrakte, sowie für Interaktionsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen, wie z. B. BODIPY-markiertem N-Ras, verwendet werden.

Sollten die GPMV direkt für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet werden, wurden diese nach ihrer Aufkonzentrierung für etwa 15 min bei 4 °C mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Lipiden *N*-Rh-DHPE bzw. NBD-DHPE in einer Konzentration von je 2 μ M (Stocklösungen je $c = 1$ mM in Methanol) inkubiert, sodass sich die markierten Lipide in die GPMV einlagern konnten. Auch hier wurden diese beiden fluoreszenzmarkierten Lipide verwendet, um die Phasenkoexistenz der GPMV sichtbar zu machen. Temperaturabhängige Messungen der GPMV wurden in diesem Fall in einer Fluoreszenzmesszelle des Modells *Small Volume Closed Bath Imaging Chamber* (Zellvolumen 36 μ L, Warner Instruments Inc.), die über ein Durchfluss-Temperierelement an der zugehörigen *Platform P-5* (Warner Instruments Inc.) befestigt wurde, durchgeführt.

Für temperaturabhängige FTIR-Studien (vgl. Kapitel 2.4.1) wurden LUV aus den isolierten GPMV-Lipidextrakten, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, in einer Konzentration von 10 mg/mL hergestellt, wobei auf den Präparationsschritt der Vesikelextrusion verzichtet wurde, da diese LUV-Lösung eine zu hohe Viskosität aufwies. Die FTIR-spektroskopischen Messungen dieser LUV erfolgten an einem FTIR-Spektrometer des Modells Nicolet Magna-IR 550 (Thermo Electron Inc.), welches ein MICHELSON-Interferometer als Interferenzeinheit und einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-A (*mercury cadmium telluride*, Quecksilber-Cadmium-Tellur) Detektor enthält. Um das Wasser-Hintergrundsignal möglichst gering zu halten, wurde der Innenraum des Spektrometers kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Aufgrund des geringen benötigten Probenvolumens wurden die Messungen in der Messzelle Diacell[®] VivoDAC (Almax easyLab Inc.) durchgeführt. Diese

membranbetriebene Diamantstempelzelle enthält ein Diamantfenster und einen Diamantstempel, die durch eine 50 µm dicke Berylliumkupfer-Dichtung auf Abstand gehalten werden, sodass ein Probenvolumen von ~40 nL entsteht. Die Temperierung erfolgte mittels eines Flüssigkeitskreislaufs über einen Thermostaten und wurde von einem unmittelbar an der Messzelle angebrachten Temperaturfühler reguliert. Für alle Messungen wurden die in der Tabelle A.4 angegebenen Einstellungen gewählt.

Tabelle A.4: Gewählte Einstellungen der Spektrometer zur *T*-abhängigen Transmissions-FTIR-Spektroskopie

<i>T</i> -abhängige Messungen der GPMV-Lipidextrakte	
Spektraler Bereich	4000-650 cm ⁻¹
Anzahl der Scans pro Spektrum	256
Spektrale Auflösung	2 cm ⁻¹ (Datenpunktabstand 0,964 cm ⁻¹)
Interferometergeschwindigkeit	1,8988 cm/s
Apodisierung	HAPP-GENZEL

Die durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Messungen erfolgten analog zu Kapitel 2.7.

Das verwendete BODIPY FL-fluoreszenzmarkierte Protein N-Ras HD/Far (GDP) wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Waldmann (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) synthetisiert und zur Verfügung gestellt [268].

Isolation und Charakterisierung der GPMV und GPMV-Lipidextrakte

Um GPMV, die Phasenkoexistenz im Bereich der Raumtemperatur besitzen, für die Anwendung in der Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie zu erhalten, wurde zunächst ein auf diese Voraussetzungen abgestimmtes Protokoll zur Isolation der GPMV von den Zellen der Zelllinie RBL-2H3 erarbeitet. Dabei war im Allgemeinen zu beobachten, dass die Phasenübergangstemperatur zur alleinigen l_d-Phase, bei der fluoreszenzmikroskopisch keinerlei Phasenkoexistenz der GPMV mehr sichtbar war, sowohl von den Kultivierungsbedingungen der RBL-2H3-Zellen als auch von der Konzentration an zugefügtem DTT während der GPMV-Abspaltung abhängig war. Die letztendlich gewählten Bedingungen sind im Detail in der experimentellen Durchführung dargestellt; bezüglich der verwendeten Reagenzien zur Auslösung der Vesikelabspaltung wurden 25 mM Formaldehyd und 3 mM DTT gewählt. Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu unterschiedlichen Stadien der GPMV-Isolation sind in Abbildung A.7 dargestellt.

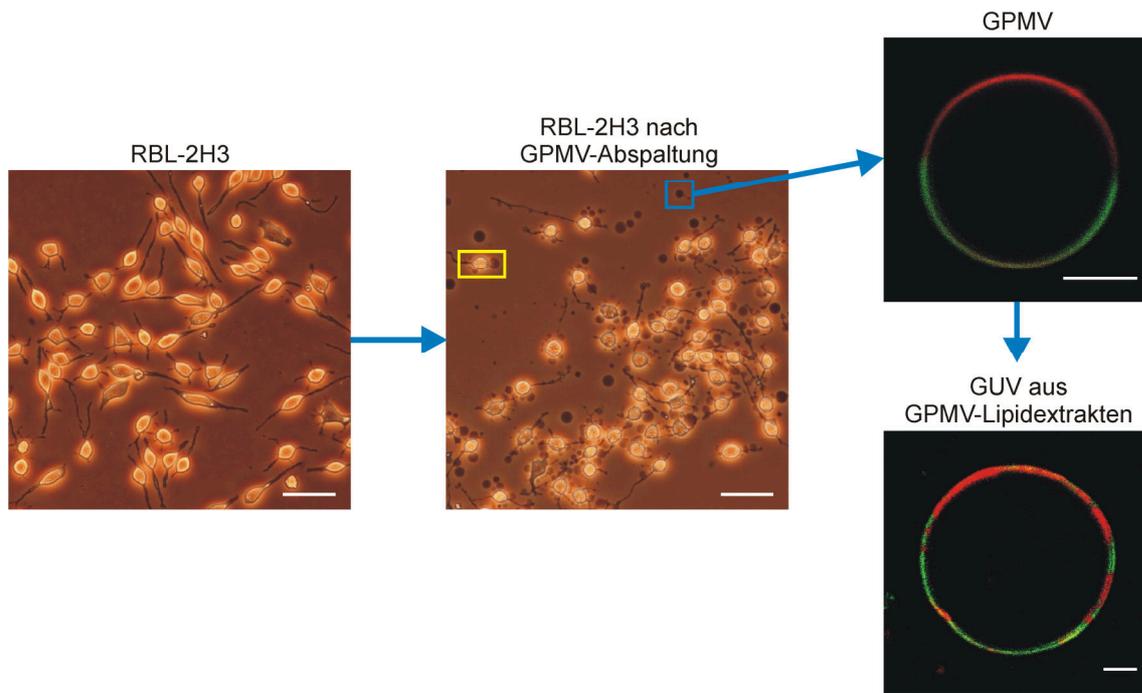


Abbildung A.7: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu unterschiedlichen Stadien der GPMV-Isolation aus RBL-2H3-Zellen. Links: RBL-2H3-Zellen vor dem Beginn der Isolation. Mitte: Zellen nach 1 h Inkubation mit 25 mM Formaldehyd und 3 mM DTT; es sind sowohl an den Zellen anhaftende (gelbes Rechteck) als auch abgespaltene (blaues Rechteck) GPMV sichtbar. Rechts oben: Isoliertes, mit *N*-Rh-DHPE (rot) und NBD-DHPE (grün, je $c = 2 \mu\text{M}$) markiertes GPMV bei Raumtemperatur. Rechts unten: GU aus GPMV-Lipidextrakten markiert mit *N*-Rh-DHPE (rot) und NBD-DHPE (grün, je $c = 0,2 \text{ mol}\%$) bei Raumtemperatur. Die Maßstäbe der Phasenkontrastaufnahmen repräsentieren $50 \mu\text{m}$, die der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen $5 \mu\text{m}$.

Nach der Zugabe der Abspaltungsreagenzien und Inkubation für 1 h sind sowohl an Zellen anhaftende, als auch freie GPMV in Lösung sichtbar (Abb. A.7, Mitte). Im weiteren Verlauf zeigen sowohl die GPMV selbst und auch die aus GPMV-Lipidextrakten erzeugten GU Phasenkoexistenz von flüssig-geordneter (grün) und flüssig-ungeordneter (rot) Lipidphase in der Fluoreszenzmikroskopie bei Raumtemperatur (Abb. A.7, rechts).

Zur weiteren Charakterisierung wurde der Lipid- und Proteingehalt der GPMV sowie der GPMV-Lipidextrakte mittels spektrophotometrischer Nachweismethoden (vgl. Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.1.4) bestimmt. Die Ergebnisse beziehen sich jeweils auf die Isolation aus einer konfluent bewachsenen Platte an RBL-2H3-Zellen und sind in Tabelle A.5 aufgeführt. Zum besseren Vergleich des Lipid- und Proteingehaltes wurde die Stoffmenge an Lipiden unter der Annahme, dass die molare Masse der Lipide im Mittel 750 g/mol beträgt, in die Lipidmasse umgerechnet und daraus der Proteingehalt der GPMV bestimmt. Die GPMV-Isolation liefert aufgrund der spezifischen Abspaltung der Vesikel von der Plasmamembran der Zellen nur eine sehr geringe Ausbeute von $\sim 45 \text{ nmol}$ bzw. $\sim 35 \mu\text{g}$ Lipiden pro konfluent bewachsener Zellkulturplatte. Diese isolierten GPMV enthalten mit $\sim 20 \mu\text{g}$ Protein einen Proteinanteil von $\sim 40\%$ (w/w) in

ihrer Membran, welches einem üblichen, auch in der Plasmamembran von Leberzellen detektierten, Gehalt entspricht [83]. Nach der Extraktion der Lipide aus den GPMV verringerte sich die Ausbeute weiter auf nur noch ~20 nmol bzw. ~15 µg Lipid pro konfluent bewachsener Zellkulturplatte. In diesen GPMV-Lipidextrakten ist kein mittels BRADFORD-Assay detektierbarer Proteinanteil mehr enthalten.

Tabelle A.5: Ergebnisse der Quantifizierung des Lipid- und Proteingehaltes

Membransystem	$n(\text{Lipid}) / \text{nmol}^*$	$m(\text{Lipid}) / \mu\text{g}^\dagger$	$m(\text{Protein}) / \mu\text{g}^*$	Proteingehalt / %
GPMV	$46,5 \pm 19,0$	$34,8 \pm 14,3$	$23,2 \pm 9,5$	~40
GPMV-Lipidextrakte	$19,1 \pm 2,5$	$14,3 \pm 1,9$	n.d. [‡]	n.d. [‡]

*Lipid/Proteinmenge pro konfluent bewachsener 75 cm² Zellkulturplatte

†Umrechnung unter der Annahme $M(\text{Lipid}) = 750 \text{ g/mol}$

‡nicht detektierbar (mittels BRADFORD-Assay)

Die Bestimmung der Lipidzusammensetzung der isolierten GPMV-Lipidextrakte erfolgte durch massenspektrometrische Analyse am Kansas Lipidomics Research Center (Kansas State University, USA). Die Zusammensetzung der Lipide der GPMV konnte nicht direkt mittels Massenspektrometrie ermittelt werden, da die GPMV in wässriger Lösung vorliegen und Proteine enthalten. Um die Lipide dieser Lipid/Protein-Mischung bestimmen zu können, müsste wiederum eine Extraktion vorgenommen werden, welches den GPMV-Lipidextrakten entsprechen würde. Im Rahmen der Untersuchung der isolierten GPMV-Lipidextrakte konnten 293 verschiedene Lipidspezies nachgewiesen werden.

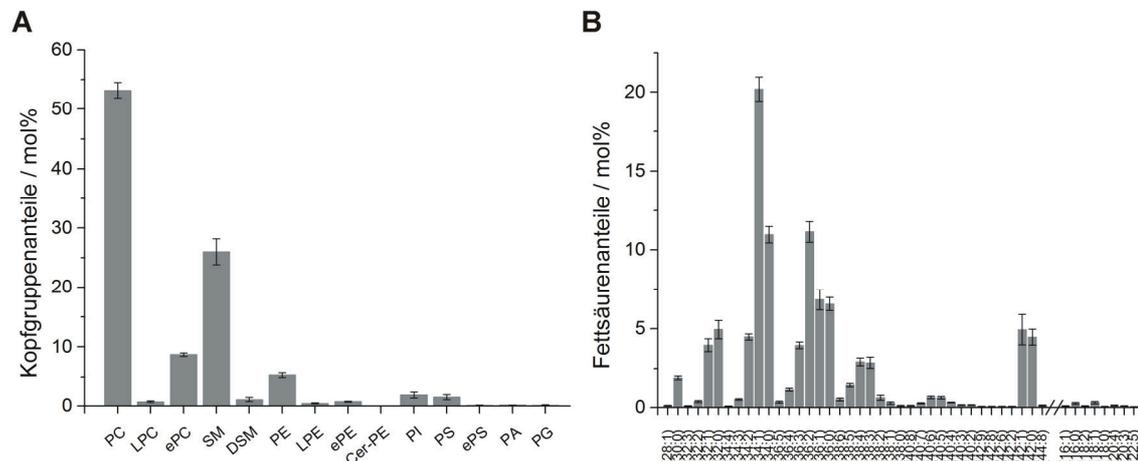


Abbildung A.8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der isolierten GPMV-Lipidextrakte. **A** Anteile der entsprechenden Phospholipidkopfguppen. PC: Phosphatidylcholin, LPC: LysoPC, ePC: etherverknüpftes PC, SM: Sphingomyelin, DSM: DihydroSM, PE: Phosphatidylethanolamin, LPE: LysoPE, ePE: etherverknüpftes PE, Cer-PE: Ceramid-PE, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, ePS: etherverknüpftes PS, PA: Phosphorsäure, *phosphatidic acid*, PG: Phosphatidylglycerol. **B** Anteile der Fettsäuren der Phospholipide an den GPMV-Lipidextrakten (Anzahl der Kohlenstoffatome : Anzahl der Doppelbindungen). Im linken Abschnitt sind die Gesamtkettenlängen und Doppelbindungen der Phospholipide mit doppelten Fettsäureketten dargestellt, rechts die Kettenlängen und Doppelbindungen der Lyso-phospholipide mit nur einer Fettsäurekette.

Abbildung A.8A zeigt, dass die neutrale, zwitterionische Phospholipidkopfgruppe Phosphatidylcholin (PC, inkl. SM und DSM) mit insgesamt 89,7 mol% den Hauptkopfgruppenbestandteil der Lipidextrakte ausmacht. Die neutrale Kopfgruppe Phosphatidylethanolamin (PE) wurde mit weiteren 6,5 mol% ermittelt; die anionischen Kopfgruppen Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphorsäure (PA, *phosphatidic acid*) und Phosphatidylglycerol (PG) wiesen zusammen nur einen geringen Anteil von ~3,7 mol% auf. Bezüglich des Lipidrückgrates bestehen die GPMV-Lipidextrakte zu 72,8 mol% aus Glycerophospholipiden und zu einem mit 27,1 mol% relativ hohen Anteil aus Phosphosphingolipiden (SM, DSM, Cer-PE). Die Glycerophospholipide liegen dabei zu 1,2 mol% als Lysolipide (LPC, LPE) vor und tragen nur eine Fettsäurekette; weitere 9,5 mol% sind mit ihren Fettsäureketten über eine Etherbindung (ePC, ePE, ePS) anstelle einer Esterbindung verknüpft.

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, kann mittels massenspektrometrischer Analyse in Bezug auf die Fettsäureketten nur eine Aussage zur Gesamtkettenlänge sowie zur Gesamtzahl an vorhandenen Doppelbindungen getroffen werden, nicht aber zur Kettenlänge der einzelnen Fettsäureketten und zur Verteilung und Position der Doppelbindungen. Lediglich unter der Annahme, dass vor allem in Säugetieren hauptsächlich Fettsäuren mit geradzahligem Kettenlänge gebildet werden [141–143] und in Lipiddoppelschichten, wie der Plasmamembran, ähnliche Kettenlängen beider Fettsäureketten vorherrschen, können mögliche Verteilungen von Fettsäureketten diskutiert werden. Die Analyse (Abb. A.8B) zeigt mit ~20,2 mol% den höchsten Anteil an Fettsäuren mit einer Gesamtkettenlänge von 34 Kohlenstoffatomen sowie einer Doppelbindung (34:1), gefolgt von den Kombinationen (36:2) und (34:0) mit einem Anteil von ~11,1 mol% bzw. ~11,0 mol%. Bei diesen drei Phospholipiden könnten es sich zweimal um Palmitoyloctadecanoylphospholipide mit den Fettsäureketten (16:0) und (18:1) bzw. (16:0) und (18:0) sowie um ein Dioctadecanoylphospholipid mit zwei Fettsäureketten (18:1) handeln. Diese Hypothese wird weiterhin von der Tatsache gestützt, dass im Fall der Lysolipide mit nur einer Fettsäurekette die Kombinationen (16:0) und (18:1) am häufigsten auftreten.

In Literaturdaten wurde hauptsächlich die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran von Leberzellen bezüglich der Kopfgruppenanteile von Glycerophospholipiden und des Gesamtanteils an Sphingomyelin beschrieben. Hier wurden Anteile von 25-40% PC, 15-25% PE und jeweils 5-10% PI bzw. PS, sowie 10-15% SM und darüber hinaus 30-40% Cholesterol detektiert [82,86,269,270]. Im Vergleich dazu wurden in den GPMV-Lipidextrakten der Zelllinie RBL-2H3 um 10 bzw. 20% höhere Anteile an SM und PC sowie entsprechend geringere Anteile an PE und den anionischen Glycerophospholipidkopfgruppen PI und PS nachgewiesen. Der Anteil an Cholesterol wurde für die GPMV-Lipidextrakte nicht ermittelt. Die Begründung für diese Abweichungen ist in

erster Linie in den unterschiedlichen Zelltypen zu suchen. Darüber hinaus könnten auch Unterschiede in den Kultivierungsbedingungen der Zellen sowie in den Isolationsmethoden verantwortlich sein.

Zur weiteren Charakterisierung der GPMV-Lipidextrakte in Bezug auf Lipidphasenumwandlungen, wurden temperaturabhängige FTIR-spektroskopische Messungen an LUV, die aus den isolierten GPMV-Lipidextrakten (10 mg/mL) in Puffer (20 mM Bis-Tris, pH 7,4 in D₂O) präpariert wurden, durchgeführt. Die experimentelle Durchführung und Auswertung dieser FTIR-Messungen erfolgte durch Christopher Rosin (Doktorand am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I). Zur Detektion der Phasenumwandlung in Lipidsystemen werden in der Regel die Banden der symmetrischen (2849-2855 cm⁻¹) und antisymmetrischen (2916-2925 cm⁻¹) Streckschwingung der CH₂-Gruppen der Lipidalkylketten, die sehr empfindlich auf Änderungen des *trans/gauche*-Verhältnisses innerhalb der Ketten reagieren, analysiert. Die temperaturabhängige Änderung des Maximums der Wellenzahl dieser symmetrischen CH₂-Streckschwingung, $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$, der GPMV-Lipidextrakte ist in Abbildung A.9 gezeigt.

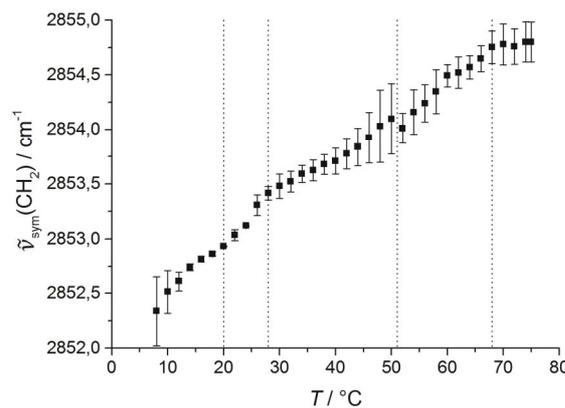


Abbildung A.9: Charakterisierung möglicher Phasenumwandlungen der isolierten GPMV-Lipidextrakte. Temperaturabhängigkeit des Maximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingungswellenzahl, $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$. Die gepunkteten Linien weisen auf nachfolgende Änderungen in der Steigung hin, die auf den Beginn eines Phasenübergangs zurückzuführen sind.

Gleichzeitig wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUV, bestehend aus den isolierten GPMV-Lipidextrakten in Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4) und mit den beiden fluoreszenzmarkierten Lipiden *N*-Rh-DHPE und NBD-DHPE (je $c = 0,2$ mol%) markiert, jeweils innerhalb des Temperaturbereichs der per FTIR-Spektroskopie detektierten Phasen angefertigt (Abb. A.10). Diese beiden fluoreszenzmarkierten Lipide wurden verwendet, um eine mögliche Phasenkoexistenz der GUV sichtbar zu machen, da sich NBD-DHPE bevorzugt in die flüssig-geordnete Phase von Lipidsystemen mit Phasenkoexistenz einlagert, wohingegen *N*-Rh-DHPE die flüssig-ungeordnete Phase bevorzugt.

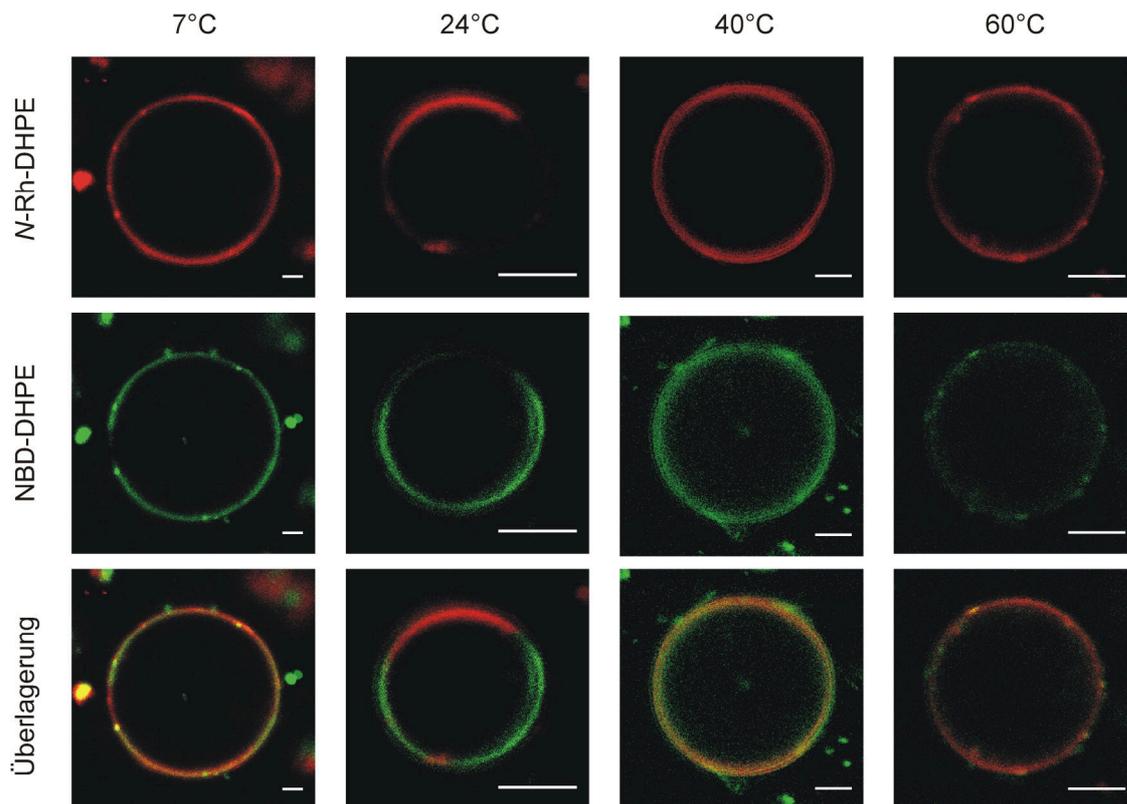


Abbildung A.10: Temperaturabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUV bestehend aus isolierten GPMV-Lipidextrakten. Zur Visualisierung der Phasenkoexistenz wurden die Vesikel mit den fluoreszenzmarkierten Lipiden *N*-Rh-DHPE (rot) und NBD-DHPE (grün, je $c = 0,2$ mol%), die bevorzugt in die l_d - bzw. l_o -Phase der Lipidsysteme partitionieren, markiert. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils 5 μm .

In den FTIR-spektroskopischen Messungen konnte im Temperaturbereich von 8 bis 20 °C eine Verschiebung des Bandenmaximums der $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$ von $\sim 2852,3 \text{ cm}^{-1}$ zu $2852,9 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet werden. Diese Wellenzahlenwerte weisen im Allgemeinen auf Lipidphasen mit hoher konformationeller Ordnung hin. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der GUV aus den GPMV-Lipidextrakten bei 7 °C zeigen eine relativ homogene Verteilung beider Fluorophore im gesamten Vesikel. Da sich *N*-Rh-DHPE im Fall der Abwesenheit einer flüssig-ungeordnete Lipidphase wahrscheinlich auch in die flüssig-geordnete Phase von Lipidsystemen einlagert, könnten diese Ergebnisse auf die Anwesenheit einer flüssig-geordneten l_o -Phase hindeuten. Im folgenden Temperaturbereich von 20 bis 28 °C kommt es zu einem sigmoidalen Anstieg der Wellenzahl, welcher auf eine Phasenumwandlung mit einem Bereich koexistierender Lipidphasen hinweist. Diese Annahme wird durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der GUV bei 24 °C bestätigt; es ist deutliche Phasenkoexistenz einer flüssig-geordneten l_o - und einer flüssig-ungeordneten l_d -Phase sichtbar. Auch AFM-Aufnahmen der isolierten GPMV-Lipidextrakte in Puffer (20 mM Tris, 7 mM MgCl_2 , pH 7,4) zeigen bei Raumtemperatur eine homogene Membran mit Phasenkoexistenz zweier Lipidphasen, wobei isolierte l_o -Domänen in einer zusammenhängenden fluiden l_d -Phase auftreten (Abb. A.11). Die koexistierenden Phasen weisen

einen Höhenunterschied von $\sim 1,0$ nm auf, welches mit Literaturdaten der Höhendifferenz von l_o - und l_d -Phasen in anderen Membransystemen übereinstimmt [88,254,271] (Experimentelle Durchführung der AFM-Messungen in Zusammenarbeit mit Dr. Katrin Weise, Postdoktorandin am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I).

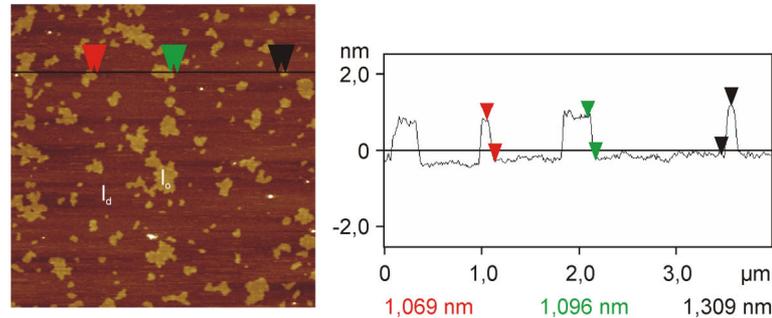


Abbildung A.11: AFM-Aufnahme der GPMV-Lipidextrakte auf Glimmer bei Raumtemperatur. Helle (l_o -Phase) und dunkelbraune (l_d -Phase) Bereiche der Membran verdeutlichen den Höhenunterschied der koexistierenden Lipidphasen. Die schwarze Linie im Bild zeigt die Lokalisation des Höhenprofils rechts, in dem der vertikale Abstand zwischen den Pfeilpaaren analysiert wird.

Bei einem weiteren Temperaturanstieg kommt es bis ~ 51 °C zu einer geringfügigen Abnahme der Steigung der Wellenzahlen $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Vesikel ab 40 °C zeigen hier wiederum eine relativ homogene Verteilung beider Fluorophore. Da in diesem Fall NBD-DHPE bei Abwesenheit einer l_o -Phase auch in die l_d -Phase partitioniert, scheint die Änderung der Steigung der Wellenzahlen in der FTIR-Spektroskopie auf die vollständige Umwandlung des Lipidsystems zu einer flüssig-ungeordneten l_d -Phase hinzuweisen. Der folgende Anstieg der Wellenzahlen im Bereich von 51 bis 68 °C ist möglicherweise auf die zunehmende Anzahl an *gauche*-Konformeren innerhalb der Alkylketten der Lipide in der flüssig-ungeordneten Lipidphase zurückzuführen. Ab einer Temperatur von 68 °C bleibt das Bandenmaximum der $\tilde{\nu}_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$ konstant bei einem Wert von $\sim 2854,8$ cm^{-1} ; hier scheint eine sich nicht mehr verändernde, homogene fluide Lipidphase erreicht worden zu sein.

Aufgrund der geringen Konzentration der isolierten GPMV in Lösung (~ 100 µg Lipid pro mL) konnten mit diesen Vesikeln keine FTIR-spektroskopischen Messungen durchgeführt werden. Zum Vergleich des temperaturabhängigen Lipidphasenverhaltens dieser Lipide und Proteine enthaltenden GPMV mit dem der GUV aus GPMV-Lipidextrakten, die keine Proteine mehr beinhalten, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abb. A.12). Hierzu wurden die GPMV ebenfalls mit den beiden fluorophormarkierten Lipiden *N*-Rh-DHPE und NBD-DHPE (je $c = 2$ µM) markiert. Der Vergleich der Aufnahmen bei den jeweiligen Temperaturen zeigt eine wesentliche Übereinstimmung des Phasenverhaltens der GPMV mit dem der GUV aus GPMV-Lipidextrakten. Hier ist eine geringfügig ausgeprägte Phasenkoexistenz bei

7 °C, und eine deutliche Koexistenz von flüssig-geordneter l_o - und flüssig-ungeordneter l_d -Phase bei 24 °C erkennbar. Sowohl bei 40 °C als auch bei 60 °C weisen die GPMV, wie auch die GUV aus den GPMV-Lipidextrakten, eine relativ homogene Verteilung der Fluorophore im gesamten Vesikel auf.

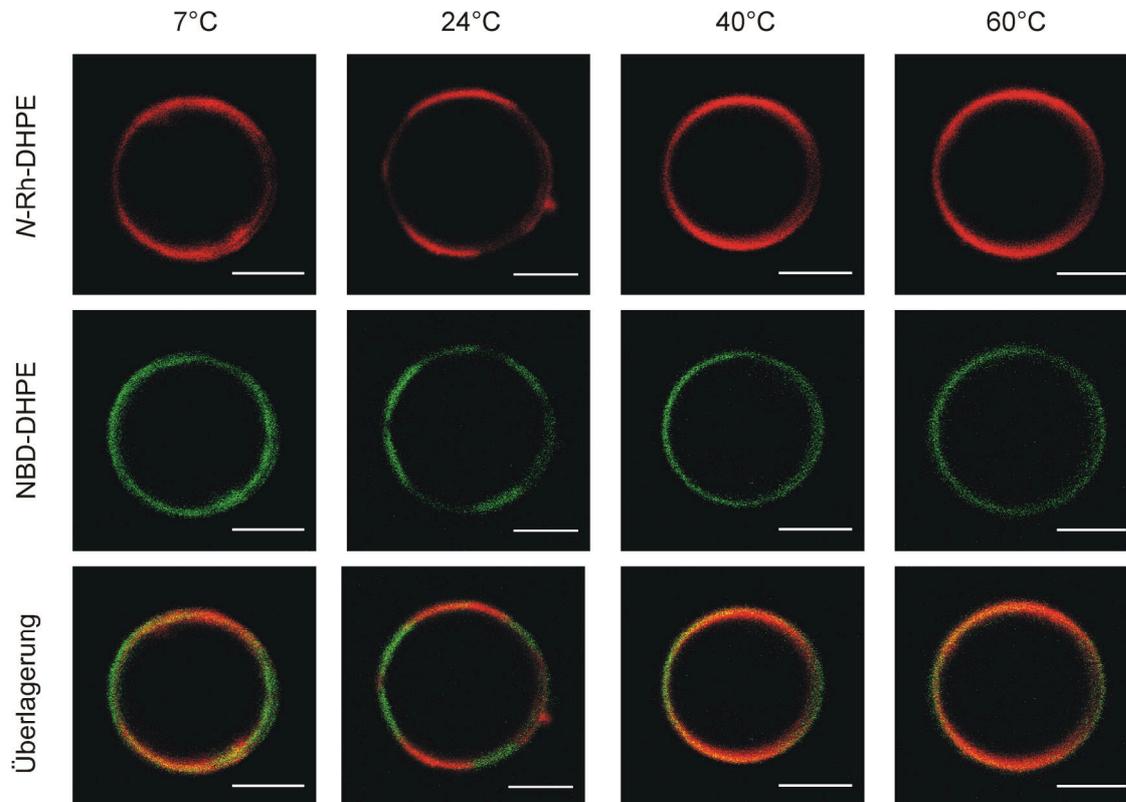


Abbildung A.12: Temperaturabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der isolierten GPMV. Zur Visualisierung der Phasenkoexistenz wurden die GPMV mit den fluoreszenzmarkierten Lipiden *N*-Rh-DHPE (rot) und NBD-DHPE (grün, je $c = 2 \mu\text{M}$), die bevorzugt in die l_d - bzw. l_o -Phase der Lipidsysteme partitionieren, markiert. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils $5 \mu\text{m}$.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in den GPMV vorhandenen Proteine keinen deutlichen im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie detektierbaren Einfluss auf das Phasenverhalten dieser natürlichen Plasmamembranlipide ausüben. Darüber hinaus scheint auch das Chloroform/Methanol-Extraktionsverfahren geeignet zu sein, um die Lipide der GPMV zu isolieren, ohne das Phasenverhalten signifikant zu verändern.

Interaktion des N-Ras mit GPMV-Lipidextrakten

Der Zweck der Isolation und Charakterisierung der GPMV und GPMV-Lipidextrakte war die Untersuchung der Interaktion der Ras-Isoformen N-Ras und K-Ras4B mit diesen komplexen plasmamembranähnlichen Lipidsystemen *in vitro*, um deren Partitionierungsverhalten in diesen natürlichen *raft*-Membranen zu bestimmen.

Zunächst wurde die Wechselwirkung und laterale Partitionierung des N-Ras HD/Far (GDP), d. h. der inaktiven dilipidierten (hexadecylierten und

farnesylierten) Form des N-Ras, in GUV aus GPMV-Lipidextrakten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Verwendung des N-Ras mit einer Hexadecylgruppe (HD) anstelle der Palmitoylgruppe erfolgte als nicht hydrolysierbares Analogon. Zur Visualisierung der Lipide und Proteine in der Fluoreszenzmikroskopie wurden die GUV mit dem fluoreszenzmarkierten Lipid *N*-Rh-DHPE ($c = 0,2 \text{ mol}\%$) und das Ras-Protein an den oberflächenzugänglichen Seitenketten der Aminosäure Lysin seiner G-Domäne mit BODIPY FL markiert. Erste Ergebnisse der Untersuchung der Interaktion von $2 \mu\text{M}$ N-Ras HD/Far (GDP) mit GUV der isolierten GPMV-Lipidextrakte in Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4) sind in Abbildung A.13 gezeigt.

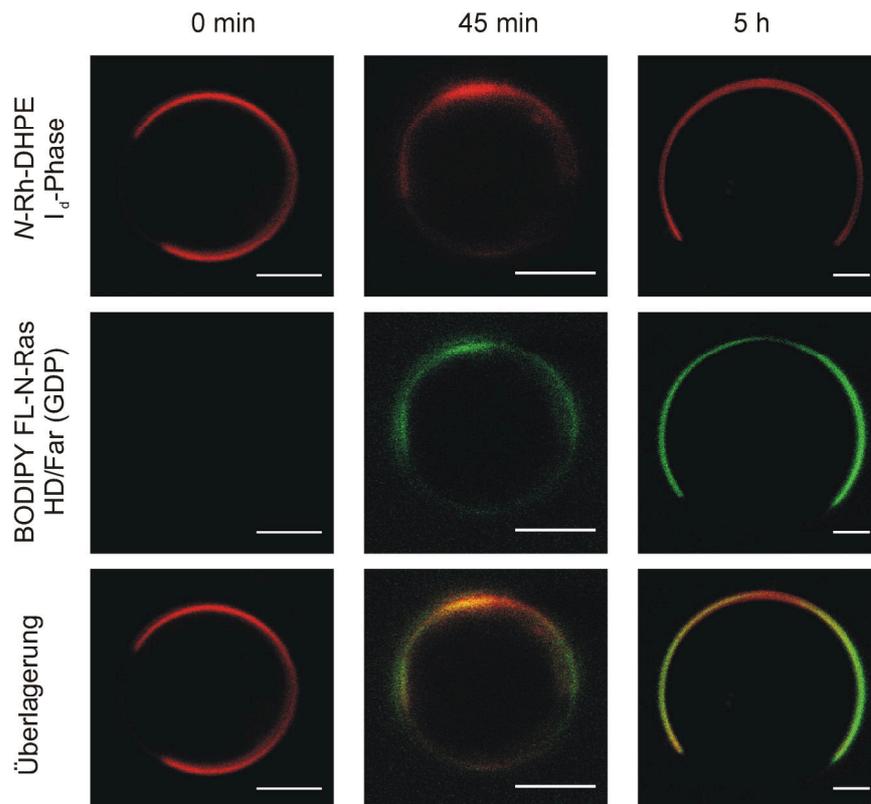


Abbildung A.13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der zeitabhängigen Interaktion von $2 \mu\text{M}$ BODIPY FL-N-Ras HD/Far (GDP) (grün) mit GUV bestehend aus GPMV-Lipidextrakten, die mit *N*-Rh-DHPE (rot, $c = 0,2 \text{ mol}\%$) markiert sind.

Bei $t = 0 \text{ min}$ sind die reinen GUV, die wiederum eine deutliche Phasenkoexistenz bei Raumtemperatur aufweisen, gezeigt. Nach Zugabe des N-Ras HD/Far (GDP) ist eine bevorzugte Einlagerung des Proteins in die mit *N*-Rh-DHPE markierte I_d -Phase der Lipidmembran erkennbar (Abb. A.13, $t = 45 \text{ min}$). Vor allem nach längerer Inkubation ($t = 5 \text{ h}$) ist die Verteilung des N-Ras HD/Far (GDP) innerhalb der I_d -Phase nicht mehr homogen. Es konnte aber auch keine Anreicherung in der Phasengrenzfläche zwischen I_0 - und I_d -Phase der Lipidmembran, wie sie mittels AFM und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie an *raft*-Modellmembranen detektiert wurde, beobachtet werden. Zur Bestimmung der Ursache dieser inhomogenen Verteilung des N-Ras HD/Far (GDP) in

der l_d -Phase dieses plasmamembranähnlichen Lipidsystems müssen weitere Messungen, z. B. mittels AFM, durchgeführt werden.

Zusammenfassung und Diskussion

Durch Anpassung der Methodik der GPMV-Isolation, bei der durch Zugabe von Formaldehyd und DTT spontan Vesikel von der Plasmamembran eukaryotischer Zellen abgeschnürt werden, konnten unilamellare Vesikel, die deutliche Phasenkoexistenz bei Raumtemperatur zeigten, isoliert werden. Neben diesen zu ~40% aus Proteinen bestehenden Vesikeln konnten außerdem proteinfreie GPMV-Lipidextrakte hergestellt werden. Aus diesen GPMV-Lipidextrakten können LUV und GUV gebildet werden; außerdem lassen sie sich auf Oberflächen, wie beispielsweise Glimmer, spreiten, sodass sie für unterschiedliche Messtechniken einsetzbar sind. Auch für diese Lipidextrakte konnte ein dem der GPMV analoges Phasenverhalten nachgewiesen werden. Somit scheint die Phasenkoexistenz dieser Lipidmischung von der Anwesenheit von Membranproteinen unabhängig zu sein. Die Grundlage der Ausbildung von Phasenkoexistenz könnte in der massenspektrometrisch ermittelten Lipidzusammensetzung der plasmamembranähnlichen Lipidsysteme zu finden sein. Mit einem Gehalt von fast 30% bestehen die GPMV-Lipidextrakte zu einem relativ hohen Anteil aus Sphingolipiden. Diese bilden aufgrund ihrer langen gesättigten Sphingosinfettsäurekette oft geordnete oder sogar sogenannte gelartige Lipidphasen aus. In einer Mischung mit Glycerophospholipiden und Cholesterol bilden sie Phasenkoexistenzbereiche von an Sphingolipiden und Cholesterol reichen s_o - oder l_o -Phasen innerhalb der l_d -Phase der Glycerophospholipide aus [89,272]. Somit könnten auch die beobachteten l_o -Phasen in den Membranen der GPMV und GPMV-Lipidextrakte reich an Sphingosin und Cholesterol sein. Darüber hinaus identifizierte die Charakterisierung der GPMV-Lipidextrakte Phosphatidylcholin als mit Abstand am häufigsten vorhandene Kopfgruppe; lediglich ~3,7 mol% anionische Lipidkopfgruppen wurden detektiert. Als häufige Kombination der Fettsäureketten treten wahrscheinlich Palmitoyloctadecanoylphospholipide bzw. Dioctadecanoylphospholipide auf. Mit 293 verschiedenen nachgewiesenen Lipidkomponenten konnte mit dieser Methode ein komplexes plasmamembranähnliches Lipidsystem, das unabhängig von der Anwesenheit von Membranproteinen Phasenkoexistenz von wahrscheinlich Sphingosin- und Cholesterolreichen Domänen mit einer an ungesättigten Lipiden angereicherten Phase bei Raumtemperatur aufweist, etabliert werden.

Dieses Lipidsystem kann im weiteren Verlauf des Projektes zur Untersuchung der Wechselwirkung und lateralen Partitionierung der Ras-Isoformen N-Ras und K-Ras4B in einem komplexen plasmamembranähnlichen Lipidsystem *in vitro* verwendet werden. Erste Ergebnisse bezüglich der Ras-Isoform N-Ras HD/Far (GDP) haben die bevorzugte Einlagerung in die fluide l_d -Phase von GUV aus GPMV-Lipidextrakten

sowie im Weiteren eine inhomogene Verteilung des Proteins innerhalb dieser Phase gezeigt. Inwieweit diese inhomogene Verteilung der in *raft*-Modellmembranen beobachteten Einlagerung des N-Ras HD/Far (GDP) in die Phasengrenzfläche der l_o - und l_d -Phase entspricht oder ob es eine andere Ursache für die inhomogene Verteilung gibt, muss mittels weiterer biophysikalischer Methoden, wie der AFM, ermittelt werden. Des Weiteren sollten zum Vergleich und zur Beurteilung des Einflusses von Membranproteinen auf das Partitionierungsverhalten des N-Ras-Proteins auch Fluoreszenzmikroskopiestudien in Anwesenheit von GPMV erfolgen. Um ein gesamtheitliches Bild der Interaktion der Ras-Proteine mit der komplexen Plasmamembran im Vergleich zu den Messungen an verschiedenen *raft*-Modellmembranen zu erlangen, müssen darüber hinaus die Wechselwirkung und das Partitionierungsverhalten der aktiven N-Ras Form, d. h. N-Ras HD/Far (GTP), des monofarnesylierten N-Ras HD/Far (GDP) und der aktiven und inaktiven Proteine K-Ras4B (GTP/GDP) in GPMV sowie in GPMV-Lipidextrakten mittels Fluoreszenzmikroskopie und AFM untersucht werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, P. D. (2011) World Population Prospects: The 2010 Revision, Volume II: Demographic Profiles.
2. Danne, T. (2012) Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2012, *diabetesDE*.
3. Busch, M. (2011) Demenzerkrankungen: Epidemiologie und Bedeutung vaskulärer Risikofaktoren, *CardioVasc* **11**, 32–38.
4. Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* **475**, 324–332.
5. Bartlett, A. I., & Radford, S. E. (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms, *Nat Struct Mol Biol* **16**, 582–588.
6. Boehr, D. D., Nussinov, R., & Wright, P. E. (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition, *Nat Chem Biol* **5**, 789–796.
7. Levinthal, C. (1969) How to Fold Graciously. In *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a Meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois* (DeBrunner, J. T. P., and Munck, E., Eds.), pp 22–24, University of Illinois Press.
8. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains, *Science* **181**, 223–230.
9. Ellis, R. J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends Biochem Sci* **26**, 597–604.
10. Krieger, F., Fierz, B., Bieri, O., Drewello, M., & Kiefhaber, T. (2003) Dynamics of Unfolded Polypeptide Chains as Model for the Earliest Steps in Protein Folding, *J Mol Biol* **332**, 265–274.
11. Morgan, G. J., & Radford, S. E. (2012) Linked Landscapes and Conformational Conversions: How Proteins Fold and Misfold. In *Protein Folding and Misfolding* (Fabian, H., and Naumann, D., Eds.), pp 1–16, Springer Berlin Heidelberg.
12. Dobson, C. M., Sali, A., & Karplus, M. (1998) Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment, *Angew Chem Int Ed* **37**, 868–893.
13. Toyama, B. H., & Weissman, J. S. (2011) Amyloid Structure: Conformational Diversity and Consequences, *Annu Rev Biochem* **80**, 557–585.
14. Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006) Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease, *Annu Rev Biochem* **75**, 333–366.
15. Greenwald, J., & Riek, R. (2010) Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation, *Structure* **18**, 1244–1260.

16. Eichner, T., & Radford, S. E. (2011) A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold, *Mol Cell* **43**, 8–18.
17. Glabe, C. G. (2008) Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers, *J Biol Chem* **283**, 29639–29643.
18. Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L., Ladihansky, V., Müller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., De Simone, A., Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., Orlova, E. V, Griffin, R. G., & Dobson, C. M. (2013) Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5468–5473.
19. Jahn, T. R., & Radford, S. E. (2008) Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways, *Arch Biochem Biophys* **469**, 100–117.
20. 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.
21. Green, J. D., Goldsbury, C., Kistler, J., Cooper, G. J. S., & Aebi, U. (2004) Human Amylin Oligomer Growth and Fibril Elongation Define Two Distinct Phases in Amyloid Formation, *J Biol Chem* **279**, 12206–12212.
22. Porat, Y., Kolusheva, S., Jelinek, R., & Gazit, E. (2003) The Human Islet Amyloid Polypeptide Forms Transient Membrane-Active Prefibrillar Assemblies, *Biochemistry* **42**, 10971–10977.
23. Meier, J. J., Kaye, R., Lin, C.-Y., Gurlo, T., Haataja, L., Jayasinghe, S., Langen, R., Glabe, C. G., & Butler, P. C. (2006) Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent β -cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP, *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1317–E1324.
24. Murphy, R. D., Conlon, J., Mansoor, T., Luca, S., Vaiana, S. M., & Buchete, N.-V. (2012) Conformational dynamics of human IAPP monomers, *Biophys Chem* **167**, 1–7.
25. Reddy, A. S., Wang, L., Singh, S., Ling, Y. L., Buchanan, L., Zanni, M. T., Skinner, J. L., & De Pablo, J. J. (2010) Stable and Metastable States of Human Amylin in Solution, *Biophys J* **99**, 2208–2216.
26. Wang, L., Schubert, D., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., & Riek, R. (2010) Multidimensional Structure-Activity Relationship of a Protein in Its Aggregated States, *Angew Chem Int Ed* **49**, 3904–3908.
27. Fowler, D. M., Koulov, A. V, Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue, *PLoS Biol* **4**, e6.
28. Fowler, D. M., Koulov, A. V, Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2007) Functional amyloid - from bacteria to humans, *Trends Biochem Sci* **32**, 217–224.
29. Sipe, J. D., & Cohen, A. S. (2000) Review: History of the Amyloid Fibril, *J Struct Biol* **130**, 88–98.

30. Janson, J., Ashley, R. H., Harrison, D., McIntyre, S., & Butler, P. C. (1999) The Mechanism of Islet Amyloid Polypeptide Toxicity Is Membrane Disruption by Intermediate-Sized Toxic Amyloid Particles, *Diabetes* **48**, 491–498.
31. Weise, K., Radovan, D., Gohlke, A., Opitz, N., & Winter, R. (2010) Interaction of hIAPP with Model Raft Membranes and Pancreatic β -Cells: Cytotoxicity of hIAPP Oligomers, *ChemBioChem* **11**, 1280–1290.
32. Kelly, J. W. (2000) Mechanisms of amyloidogenesis, *Nat Struct Biol* **7**, 824–826.
33. Bhak, G., Choe, Y.-J., & Paik, S. R. (2009) Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation, *BMB reports* **42**, 541–551.
34. Lee, J., Culyba, E. K., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2011) Amyloid- β Forms Fibrils by Nucleated Conformational Conversion of Oligomers, *Nat Chem Biol* **7**, 602–609.
35. Wei, L., Jiang, P., Xu, W., Li, H., Zhang, H., Yan, L., Chan-Park, M. B., Liu, X.-W., Tang, K., Mu, Y., & Pervushin, K. (2011) The Molecular Basis of Distinct Aggregation Pathways of Islet Amyloid Polypeptide, *J Biol Chem* **286**, 6291–6300.
36. Modler, A. J., Gast, K., Lutsch, G., & Damaschun, G. (2003) Assembly of Amyloid Protofibrils via Critical Oligomers—A Novel Pathway of Amyloid Formation, *J Mol Biol* **325**, 135–148.
37. Žerovnik, E., Stoka, V., Mirtič, A., Gunčar, G., Grdadolnik, J., Staniforth, R. a, Turk, D., & Turk, V. (2011) Mechanisms of amyloid fibril formation - focus on domain-swapping, *FEBS J* **278**, 2263–2282.
38. Sparr, E., Engel, M. F. M., Sakharov, D. V., Sprong, M., Jacobs, J., De Kruijff, B., Höppener, J. W. M., & Killian, J. A. (2004) Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers, *FEBS Lett* **577**, 117–120.
39. Engel, M. F. M. (2009) Membrane permeabilization by Islet Amyloid Polypeptide, *Chem Phys Lipids* **160**, 1–10.
40. Opie, E. L. (1901) The Relation of Diabetes Mellitus to Lesions of the Pancreas. Hyaline Degeneration of the Islands of Langerhans, *J Exp Med* **5**, 527–540.
41. Weichselbaum, A., & Stangl, E. (1901) Zur Kenntnis der feineren Veränderungen des Pankreas bei Diabetes mellitus, *Wien Klin Wochenschr* **14**, 968–972.
42. Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D. W., O'Brien, T. D., & Johnson, K. H. (1987) Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3881–3885.
43. Cooper, G. J. S., Willis, A. C., Clark, A., Turner, R. C., Sim, R. B., & Reid, K. B. M. (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients, *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8628–8632.
44. Westermark, P., Andersson, A., & Westermark, G. T. (2011) Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus, *Physiol Rev* **91**, 795–826.

45. Seeliger, J., & Winter, R. (2012) Islet Amyloid Polypeptide: Aggregation and Fibrillogenesis in vitro and Its Inhibitor. In *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease* (Harris, J. R., Ed.), pp 185–209, Springer Science + Business Media, Dordrecht.
46. Sanke, T., Bell, G. I., Sample, C., Rubenstein, A. H., & 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.
47. Nishi, M., Sanke, T., Nagamatsu, S., Bell, G. I., & Steiner, D. F. (1990) Islet Amyloid Polypeptide, *J Biol Chem* **265**, 4173–4176.
48. Marzban, L., Trigo-Gonzalez, G., Zhu, X., Rhodes, C. J., Halban, P. A., Steiner, D. F., & Verchere, C. B. (2004) Role of -Cell Prohormone Convertase (PC) 1/3 in Processing of Pro-Islet Amyloid Polypeptide, *Diabetes* **53**, 141–148.
49. Wang, J., Xu, J., Finnerty, J., Furuta, M., Steiner, D. F., & Verchere, C. B. (2001) The Prohormone Convertase Enzyme 2 (PC2) Is Essential for Processing Pro-Islet Amyloid Polypeptide at the NH₂-Terminal Cleavage Site, *Diabetes* **50**, 534–539.
50. Marzban, L., Soukhatcheva, G., & Verchere, C. B. (2005) Role of Carboxypeptidase E in Processing of Pro-Islet Amyloid Polypeptide in β -Cells, *Endocrinology* **146**, 1808–1817.
51. Milgram, S. L., Kho, S. T., Martin, G. V., Mains, R. E., & Eipper, B. A. (1997) Localization of integral membrane peptidylglycine α -amidating monooxygenase in neuroendocrine cells, *J Cell Sci* **110**, 695–706.
52. McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., & Foord, S. M. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor, *Nature* **393**, 333–339.
53. Muff, R., Bühlmann, N., Fischer, J. A., & Born, W. (1999) An Amylin Receptor is Revealed following Co-transfection of a Calcitonin Receptor with Receptor Activity Modifying Proteins-1 or -3, *Endocrinology* **140**, 2924–2927.
54. Christopoulos, G., Perry, K. J., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N. J., Main, M. J., Foord, S. M., & Sexton, P. M. (1999) Multiple Amylin Receptors Arise from Receptor Activity-Modifying Protein Interaction with the Calcitonin Receptor Gene Product, *Mol Pharmacol* **56**, 235–242.
55. Martínez, A., Kapas, S., Miller, M.-J., Ward, Y., & Cuttitta, F. (2000) Coexpression of Receptors for Adrenomedullin, Calcitonin Gene-Related Peptide, and Amylin in Pancreatic β -Cells, *Endocrinology* **141**, 406–411.
56. Ueda, T., Ugawa, S., Saishin, Y., & Shimada, S. (2001) Expression of receptor-activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain, *Mol Brain Res* **93**, 36–45.
57. Barth, S. W., Riediger, T., Lutz, T. a., & Rechkemmer, G. (2004) Peripheral amylin activates circumventricular organs expressing calcitonin receptor a/b subtypes and receptor-activity modifying proteins in the rat, *Brain Res* **997**, 97–102.
58. Dégano, P., Silvestre, R. A., Salas, M., Peiró, E., & Marco, J. (1993) Amylin inhibits glucose-induced insulin secretion in a dose-dependent manner. Study in the perfused rat pancreas, *Regul Pept* **43**, 91–96.

59. Sandler, S., & Stridsberg, M. (1994) Chronic exposure of cultured rat pancreatic islets to elevated concentrations of islet amyloid polypeptide (IAPP) causes a decrease in islet DNA content and medium insulin accumulation, *Regul Pept* **53**, 103–109.
60. Broderick, C. L., Brooke, G. S., DiMarchi, R. D., & Gold, G. (1991) Human and rat amylin have no effect on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets, *Biochem Biophys Res Commun* **177**, 932–938.
61. O'Brien, T. D., Westermark, P., & Johnson, K. H. (1990) Islet amyloid polypeptide (IAPP) does not inhibit glucose-stimulated insulin secretion from isolated perfused rat pancreas, *Biochem Biophys Res Commun* **170**, 1223–1228.
62. Akesson, B., Panagiotidis, G., Westermark, P., & Lundquist, I. (2003) Islet amyloid polypeptide inhibits glucagon release and exerts a dual action on insulin release from isolated islets, *Regul Pept* **111**, 55–60.
63. Silvestre, R. A., Rodríguez-Gallardo, J., Jodka, C., Parkes, D. G., A, P. R., Young, A. A., & Marco, J. (2001) Selective amylin inhibition of the glucagon response to arginine is extrinsic to the pancreas, *Am J Physiol Endocrinol Metab* E443–E449.
64. Panagiotidis, G., Salehi, A. A., Westermark, P., & Lundquist, I. (1992) Homologous islet amyloid polypeptide: effects on plasma levels of glucagon, insulin and glucose in the mouse, *Diabetes Res Clin Pract* **18**, 167–171.
65. Chapman, I., Parker, B., Doran, S., Feinle-Bisset, C., Wishart, J., Lush, C. W., Chen, K., LaCerte, C., Burns, C., McKay, R., Weyer, C., & Horowitz, M. (2007) Low-dose Pramlintide Reduced Food Intake and Meal Duration in Healthy, Normal-Weight Subjects, *Obesity* **15**, 1179–1186.
66. Christopoulos, G., Sexton, P. M., Paxinos, G., Huang, X.-F., Beaumont, K., & Toga, A. W. (1995) Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene related peptide and calcitonin in rat and monkey brain, *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 1037–1041.
67. Naot, D., & Cornish, J. (2008) The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism, *Bone*, Elsevier Inc. **43**, 813–818.
68. Brain, S. D., Wimalawansa, S., MacIntyre, I., & Williams, T. J. (1990) The Demonstration of Vasodilator Activity of Pancreatic Amylin Amide in the Rabbit, *Am J Pathol* **136**, 487–490.
69. Westermark, G. T., Westermark, P., Nordin, A., Törnelius, E., & Andersson, A. (2003) Formation of amyloid in human pancreatic islets transplanted to the liver and spleen of nude mice, *Uppsala J Med Sci* **108**, 193–203.
70. Janson, J., Soeller, W. C., Roche, P. C., Nelson, R. T., Torchia, a J., Kreutter, D. K., & Butler, P. C. (1996) Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7283–7288.
71. 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.

72. Kaye, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., & Glabe, C. G. (2004) Permeabilization of Lipid Bilayers Is a Common Conformation-dependent Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases, *J Biol Chem* **279**, 46363–46366.
73. Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., & Lal, R. (2005) Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10427–10432.
74. Knight, J. D., Hebda, J. A., & Miranker, A. D. (2006) Conserved and Cooperative Assembly of Membrane-Bound α -Helical States of Islet Amyloid Polypeptide, *Biochemistry* **45**, 9496–9508.
75. Abedini, A., & Raleigh, D. P. (2009) A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides, *Protein Eng Des Sel* **22**, 453–459.
76. Engel, M. F. M., Khemtémourian, L., Kleijer, C. C., Meeldijk, H. J. D., Jacobs, J., Verkleij, A. J., De Kruijff, B., Killian, J. A., & Höppener, J. W. M. (2008) Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6033–6038.
77. 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.
78. Knight, J. D., & Miranker, A. D. (2004) Phospholipid Catalysis of Diabetic Amyloid Assembly, *J Mol Biol* **341**, 1175–1187.
79. Bedrood, S., Li, Y., Isas, J. M., Hegde, B. G., Baxa, U., Haworth, I. S., & Langen, R. (2012) Fibril Structure of Human Islet Amyloid Polypeptide, *J Biol Chem* **287**, 5235–5241.
80. Kapurniotu, A. (2001) Amyloidogenicity and Cytotoxicity of Islet Amyloid Polypeptide, *Biopolymers* **60**, 438–459.
81. Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* **175**, 720–731.
82. Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112–124.
83. Korn, E. D. (1969) Cell Membranes: Structure and Synthesis, *Annu Rev Biochem* **38**, 263–288.
84. Dowhan, W. (1997) Molecular Basis For Membrane Phospholipid Diversity: Why Are There So Many Lipids?, *Annu Rev Biochem* **66**, 199–232.
85. Shevchenko, A., & Simons, K. (2010) Lipidomics: coming to grips with lipid diversity, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 593–598.
86. Van Meer, G., & De Kroon, A. I. P. M. (2011) Lipid map of the mammalian cell, *J Cell Sci* **124**, 5–8.

87. Winter, R., Noll, F., & Czeslik, C. (2011) *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Vieweg+Teubner.
88. Kapoor, S., Werkmüller, A., Denter, C., Zhai, Y., Markgraf, J., Weise, K., Opitz, N., & Winter, R. (2011) Temperature-pressure phase diagram of a heterogeneous anionic model biomembrane system: Results from a combined calorimetry, spectroscopy and microscopy study, *Biochim Biophys Acta* **1808**, 1187–1195.
89. Nicolini, C., Kraineva, J., Khurana, M., Periasamy, N., Funari, S. S., & Winter, R. (2006) Temperature and pressure effects on structural and conformational properties of POPC/SM/cholesterol model raft mixtures - a FT-IR, SAXS, DSC, PPC and Laurdan fluorescence spectroscopy study, *Biochim Biophys Acta* **1758**, 248–258.
90. Nicolini, C., Celli, A., Gratton, E., & Winter, R. (2006) Pressure Tuning of the Morphology of Heterogeneous Lipid Vesicles: A Two-Photon-Excitation Fluorescence Microscopy Study, *Biophys J* **91**, 2936–2942.
91. Kaiser, H.-J., Lingwood, D., Levental, I., Sampaio, J. L., Kalvodova, L., Rajendran, L., & Simons, K. (2009) Order of lipid phases in model and plasma membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16645–16650.
92. Levental, I., Grzybek, M., & Simons, K. (2011) Raft domains of variable properties and compositions in plasma membrane vesicles, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11411–11416.
93. Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., & Hörber, J. K. (2000) Sphingolipid-Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells, *J Cell Biol* **148**, 997–1008.
94. Simons, K., & Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes, *Nature* **387**, 569–572.
95. Munro, S. (2003) Lipid Rafts: Elusive or Illusive?, *Cell* **115**, 377–388.
96. Lingwood, D., & Simons, K. (2010) Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle, *Science* **327**, 46–50.
97. Hancock, J. F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints, *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 456–462.
98. Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B., & Maechler, P. (2004) Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells, *Endocrinology* **145**, 667–678.
99. Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., & Wollheim, C. B. (1992) Establishment of 2-Mercaptoethanol-Dependent Differentiated Insulin-Secreting Cell Lines, *Endocrinology* **130**, 167–178.
100. Berridge, M. V, Tan, A. N. S., McCoy, K. D., & Wang, R. U. I. (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts, *Biochemica* **14**–19.
101. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959) A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917.

102. Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *J Biol Chem* **226**, 497–509.
103. Bartlett, G. R. (1958) Phosphorus Assay in Column Chromatography, *J Biol Chem* **234**, 466–468.
104. Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal Biochem* **72**, 248–254.
105. Hope, M. J., Bally, M. B., D., M. L., Janoff, A. S., & Cullis, P. R. (1986) Generation Of Multilamellar And Unilamellar Phospholipid Vesicles, *Chem Phys Lipids* **40**, 89–107.
106. Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., & Janoff, A. S. (1985) Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles, *Biochim Biophys Acta* **817**, 193–196.
107. Mayer, L. D., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *Biochim Biophys Acta* **858**, 161–168.
108. Angelova, M. I., & Dimitrov, D. S. (1986) Liposome Electroformation, *Faraday Discuss Chem Soc* **81**, 303–311.
109. Reeves, J. P., & Dowben, R. M. (1969) Formation and Properties of Thin-walled Phospholipid Vesicles, *J Cell Physiol* **73**, 49–60.
110. 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.
111. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim Biophys Acta* **1767**, 1073–1101.
112. Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., & Goñi, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Prog Biophys molec Biol* **59**, 23–56.
113. 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.
114. Goos, F., & Hänchen, H. (1947) Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion, *Ann Physik* **6**, 333–346.
115. 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.
116. Goormaghtigh, E., Raussens, V., & Ruyschaert, J. (1999) Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes, *Biochim Biophys Acta* **1422**, 105–185.
117. Mantsch, H. H., Moffatt, D. J., & Casal, H. L. (1988) Fourier Transform Methods for Spectral Resolution Enhancement, *J Mol Struct* **173**, 285–298.

118. Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H., & Cameron, D. G. (1981) Fourier self-deconvolution: A method for resolving intrinsically overlapping bands, *Appl Spectrosc* **35**, 271–276.
119. Cameron, D. G., & Moffatt, D. J. (1987) A Generalized Approach to Derivative Spectroscopy, *Appl Spectrosc* **41**, 539–544.
120. Byler, D. M., & Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers* **25**, 469–487.
121. Tatulian, S. A. (2003) Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Method of Choice for Studying Membrane Proteins and Lipids, *Biochemistry* **42**, 11898–11907.
122. Marquardt, D. W. (1963) An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters, *J Soc Ind Appl Math* **11**, 431–441.
123. Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C., & Donald, A. M. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J Struct Biol* **149**, 30–37.
124. Biancalana, M., & Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1405–1412.
125. Stsiapura, V. I., Maskevich, A. A., Kuzmitsky, V. A., Uversky, V. N., Kuznetsova, I. M., & Turoverov, K. K. (2008) Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity, *J Phys Chem B* **112**, 15893–15902.
126. Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2001) Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism, *Biochemistry* **40**, 6036–6046.
127. Price, R. L., & Jerome, W. G. (2011) *Basic Confocal Microscopy*, Springer Science+Business Media, LLC, New York.
128. Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Opt Lett* **19**, 780–782.
129. Murphy, D. B., Oldfield, R., Schwartz, S., & Davidson, M. W. *Phase Contrast Microscopy*, Nikon MicroscopyU.
130. Zernike, F. (1942) Phase Contrast, A New Method For The Microscopic Observation Of Transparent Objects - Part I, *Physica* **IX**, 686–698.
131. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science+Business Media, LLC.
132. Valeur, B. (2001) *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Wiley-VCH.
133. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat Methods* **9**, 676–682.

134. Zlatanova, J., Lindsay, S. M., & Leuba, S. H. (2000) Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope, *Prog Biophys Mol Biol* **74**, 37–61.
135. Jalili, N., & Laxminarayana, K. (2004) A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences, *Mechatronics* **14**, 907–945.
136. Jha, S., Sellin, D., Seidel, R., & 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.
137. Weise, K., Mishra, R., Jha, S., Sellin, D., Radovan, D., Gohlke, A., Jeworrek, C., Seeliger, J., Möbitz, S., & Winter, R. (2011) Interaction of hIAPP and Its Precursors with Model and Biological Membranes. In *Lipids and Cellular Membranes in Amyloid Diseases* (Jelinek, R., Ed.), pp 93–120, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
138. Seeliger, J., Evers, F., Jeworrek, C., Kapoor, S., Weise, K., Andreetto, E., Tolan, M., Kapurniotu, A., & Winter, R. (2012) Cross-Amyloid Interaction of A β and IAPP at Lipid Membranes, *Angew Chem Int Ed* **51**, 679–683.
139. Seeliger, J. (2010) Untersuchung der Wechselwirkung des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP) mit Membranen, Masterarbeit, Technische Universität Dortmund.
140. Seeliger, J., Weise, K., Opitz, N., & Winter, R. (2012) The Effect of A β on IAPP Aggregation in the Presence of an Isolated β -Cell Membrane, *J Mol Biol* **421**, 348–363.
141. Diedrich, M., & Macholz, R. (1989) The natural occurrence of odd numbered fatty acids in animal and man, *Zeitschrift Gesamte Hyg Ihre Grenzgeb* **35**, 74–77.
142. Diedrich, M., & Henschel, K.-P. (1990) The natural occurrence of unusual fatty acids Part 1. Odd numbered fatty acids, *Die Nahrung* **34**, 935–943.
143. R̃ezanka, T., & Sigler, K. (2009) Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms, *Prog Lipid Res* **48**, 206–238.
144. Turk, J., Wolf, B. a., Lefkowitz, J. B., Stump, W. T., & McDaniel, M. L. (1986) Glucose-induced phospholipid hydrolysis in isolated pancreatic islets: quantitative effects on the phospholipid content of arachidonate and other fatty acids, *Biochim Biophys Acta, Lipids Lipid Metab* **879**, 399–409.
145. Hallberg, A. (1984) Effects of Starvation and Different Culture Conditions on the Phospholipid Content of Isolated Pancreatic Islets, *Biochim Biophys Acta* **796**, 328–335.
146. Rustenbeck, I., Matthies, a, & Lenzen, S. (1994) Lipid composition of glucose-stimulated pancreatic islets and insulin-secreting tumor cells., *Lipids* **29**, 685–92.
147. Jayasinghe, S. A., & Langen, R. (2005) Lipid Membranes Modulate the Structure of Islet Amyloid Polypeptide, *Biochemistry* **44**, 12113–12119.
148. 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.

149. Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., & Feldman, E. L. (2010) How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology?, *Nat Rev Neurol* **6**, 551–559.
150. Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J. E., O'Brien, P., Petersen, R. C., & Butler, P. C. (2004) Increased Risk of Type 2 Diabetes in Alzheimer Disease, *Diabetes* **53**, 474–481.
151. Nicolls, M. R. (2004) The Clinical and Biological Relationship between Type II Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease, *Curr Alzheimer Res* **1**, 47–54.
152. DeToma, A. S., Salamekh, S., Ramamoorthy, A., & Lim, M. H. (2012) Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes, *Chem Soc Rev* **41**, 608–621.
153. O'Nuallain, B., Williams, A. D., Westermarck, P., & Wetzel, R. (2004) Seeding Specificity in Amyloid Growth Induced by Heterologous Fibrils, *J Biol Chem* **279**, 17490–17499.
154. Andreetto, E., Yan, L.-M., Tatarek-Nossol, M., Velkova, A., Frank, R., & Kapurniotu, A. (2010) Identification of Hot Regions of the A β -IAPP Interaction Interface as High-Affinity Binding Sites in both Cross- and Self-Association, *Angew Chem Int Ed* **49**, 3081–3085.
155. Zinser, E. G., Hartmann, T., & Grimm, M. O. W. (2007) Amyloid beta-protein and lipid metabolism, *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1991–2001.
156. Simons, M., De Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P. J., Dotti, C. G., & Beyreuther, K. (1996) Amyloidogenic Processing of the Human Amyloid Precursor Protein in Primary Cultures of Rat Hippocampal Neurons, *J Neurosci* **16**, 899–908.
157. Selkoe, D. J. (1996) Amyloid β -Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease, *J Biol Chem* **271**, 18295–18298.
158. Yip, C. M., & McLaurin, J. (2001) Amyloid- β Peptide Assembly: A Critical Step in Fibrillogenesis and Membrane Disruption, *Biophys J* **80**, 1359–1371.
159. Verdier, Y., Zarándi, M., & Penke, B. (2004) Amyloid β -Peptide Interactions with Neuronal and Glial Cell Plasma Membrane: Binding Sites and Implications for Alzheimer's Disease, *J Peptide Sci* **10**, 229–248.
160. Chi, E. Y., Ege, C., Winans, A., Majewski, J., Wu, G., Kjaer, K., & Lee, K. Y. C. (2008) Lipid membrane templates the ordering and induces the fibrillogenesis of Alzheimer's disease amyloid- β peptide, *Proteins* **72**, 1–24.
161. McLaurin, J., & Chakrabarty, A. (1997) Characterization of the interactions of Alzheimer β -amyloid peptides with phospholipid membranes, *Eur J Biochem* **245**, 355–363.
162. Wong, P. T., Schauerte, J. A., Wissner, K. C., Ding, H., Lee, E. L., Steel, D. G., & Gafni, A. (2009) Amyloid- β Membrane Binding and Permeabilization are Distinct Processes Influenced Separately by Membrane Charge and Fluidity, *J Mol Biol* **386**, 81–96.
163. Williams, T. L., & Serpell, L. C. (2011) Membrane and surface interactions of Alzheimer's A β peptide - insights into the mechanism of cytotoxicity, *FEBS J* **278**, 3905–3917.

164. Yan, L.-M., Velkova, A., Tatarek-Nossol, M., Andreetto, E., & Kapurniotu, A. (2007) IAPP Mimic Blocks A β Cytotoxic Self-Assembly: Cross-Suppression of Amyloid Toxicity of A β and IAPP Suggests a Molecular Link between Alzheimer's disease and Type II Diabetes, *Angew Chem Int Ed* **46**, 1246–1252.
165. Sani, M.-A., Gehman, J. D., & Separovic, F. (2011) Lipid matrix plays a role in Abeta fibril kinetics and morphology, *FEBS Lett*, Federation of European Biochemical Societies **585**, 749–754.
166. Curtain, C. C., Ali, F. E., Smith, D. G., Bush, A. I., Masters, C. L., & Barnham, K. J. (2003) Metal Ions, pH, and Cholesterol Regulate the Interactions of Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptide with Membrane Lipid, *J Biol Chem* **278**, 2977–2982.
167. Pepys, M. B. (2001) Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis, *Phil Trans R Soc Lond B* **356**, 203–211.
168. Bellotti, V., & Chiti, F. (2008) Amyloidogenesis in its biological environment: challenging a fundamental issue in protein misfolding diseases, *Curr Opin Struct Biol* **18**, 771–779.
169. Pepys, M. B., Rademacher, T. W., Amatayakul-Chantler, S., Williams, P., Noble, G. E., Hutchinson, W. L., Hawkins, P. N., Nelson, S. R., Gallimore, J. R., & Herbert, J. (1994) Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5602–5606.
170. Jha, S., Patil, S. M., Gibson, J., Nelson, C. E., Alder, N. N., & Alexandrescu, A. T. (2011) Mechanism of Amylin Fibrillization Enhancement by Heparin, *J Biol Chem* **286**, 22894–22904.
171. Abedini, A., Tracz, S. M., Cho, J.-H., & Raleigh, D. P. (2006) Characterization of the Heparin Binding Site in the N-terminus of Human Pro-Islet Amyloid Polypeptide: Implications for Amyloid Formation, *Biochemistry* **45**, 9228–9237.
172. Castillo, G. M., Cummings, J. A., Yang, W., Judge, M. E., Sheardown, M. J., Rimvall, K., Hansen, J. B., & Snow, A. D. (1998) Sulfate Content and Specific Glycosaminoglycan Backbone of Perlecan Are Critical for Perlecan's Enhancement of Islet Amyloid Polypeptide (Amylin) Fibril Formation, *Diabetes* **47**, 612–620.
173. Cohlberg, J. A., Li, J., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2002) Heparin and Other Glycosaminoglycans Stimulate the Formation of Amyloid Fibrils from α -Synuclein in Vitro, *Biochemistry* **41**, 1502–1511.
174. Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Bryszewska, M., & Cladera, J. (2006) Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases, *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 577–582.
175. Andersson, K., Pokrzywa, M., Dacklin, I., & Lundgren, E. (2013) Inhibition of TTR Aggregation-Induced Cell Death - A New Role for Serum Amyloid P Component, *PLoS ONE* **8**, e55766.
176. Janciauskiene, S., García de Frutos, P., Carlemalm, E., Dahlbäck, B., & Eriksson, S. (1995) Inhibition of Alzheimer β -Peptide Fibril Formation by Serum Amyloid P Component, *J Biol Chem* **270**, 26041–26044.

177. Coker, A. R., Purvis, A., Baker, D., Pepys, M. B., & Wood, S. P. (2000) Molecular chaperone properties of serum amyloid P component, *FEBS Lett* **473**, 199–202.
178. Tennent, G. A., Lovat, L. B., & Pepys, M. B. (1995) Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4299–4303.
179. Emsley, J., White, H. E., O'Hara, B. P., Oliva, G., Srinivasan, N., Tickle, I. J., Blundell, T. L., Pepys, M. B., & Wood, S. P. (1994) Structure of pentameric human serum amyloid P component, *Nature* **367**, 338–345.
180. Pepys, M. B., Dash, A. C., Markham, R. E., Thomas, H. C., Williams, B. D., & Petrie, A. (1978) Comparative clinical study of protein SAP (amyloid P component) and C-reactive protein in serum, *Clin exp Immunol* **32**, 119–124.
181. Hawkins, P. N., Rossor, M. N., Gallimore, J. R., Miller, B., Moore, E. G., & Pepys, M. B. (1994) Concentration of Serum Amyloid P Component in the CSF as a Possible Marker of Cerebral Amyloid Deposits in Alzheimer's Disease, *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 722–726.
182. Sørensen, I. J., Andersen, O., Nielsen, E. H., & Svehag, S. E. (1995) Native Human Serum Amyloid P Component is a Single Pentamer, *Scand J Immunol* **41**, 263–267.
183. Aquilina, J. A., & Robinson, C. V. (2003) Investigating interactions of the pentraxins serum amyloid P component and C-reactive protein by mass spectrometry, *Biochem J* **375**, 323–328.
184. Hamazaki, H. (1987) Ca²⁺-mediated Association of Human Serum Amyloid P Component with Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate, *J Biol Chem* **262**, 1456–1460.
185. Dyck, R. F., Lockwood, C. M., Kershaw, M., McHugh, N., Duance, V. C., Baltz, M. L., & Pepys, M. B. (1980) Amyloid P-Component is a Constituent of Normal Human Glomerular Basement Membrane, *J Exp Med* **152**, 1162–1174.
186. Pepys, M. B., Dyck, R. F., De Beer, F. C., Skinner, M., & Cohen, A. S. (1979) Binding of serum amyloid P-component (SAP) by amyloid fibrils, *Clin exp Immunol* **34**, 284–293.
187. Finn, T. E., Nunez, A. C., Sunde, M., & Easterbrook-Smith, S. B. (2012) Serum Albumin Prevents Protein Aggregation and Amyloid Formation and Retains Chaperone-like Activity in the Presence of Physiological Ligands, *J Biol Chem* **287**, 21530–21540.
188. Minton, A. P. (2001) The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media, *J Biol Chem* **276**, 10577–10580.
189. McGuffee, S. R., & Elcock, A. H. (2010) Diffusion, crowding & protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm, *PLoS Comput Biol* **6**, e1000694.
190. Jiao, M., Li, H.-T., Chen, J., Minton, A. P., & Liang, Y. (2010) Attractive protein-polymer interactions markedly alter the effect of macromolecular crowding on protein association equilibria, *Biophys J* **99**, 914–923.

191. Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., & Jahn, R. (2006) Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle, *Cell* **127**, 831–846.
192. Wenner, J. R., & Bloomfield, V. A. (1999) Crowding Effects on EcoRV Kinetics and Binding, *Biophys J* **77**, 3234–3241.
193. Le Coeur, C., Demé, B., & Longeville, S. (2009) Compression of random coils due to macromolecular crowding, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **79**, 031910.
194. Hirata, Y., Sano, Y., Aoki, M., Shohji, H., Katoh, S., Abe, J., Hitsukuri, S., & Yamamoto, H. (2003) Small-angle X-ray scattering studies of moderately concentrated dextran solution, *Carbohydr Polym* **53**, 331–335.
195. Minton, A. P. (2007) The Effective Hard Particle Model Provides a Simple, Robust, and Broadly Applicable Description of Nonideal Behavior in Concentrated Solutions of Bovine Serum Albumin and Other Nonassociating Proteins, *J Pharm Sci* **96**, 3466–3469.
196. Moon, Y. U., Curtis, R. A., Anderson, C. O., Blanch, H. W., & Prausnitz, J. M. (2000) Protein–Protein Interactions in Aqueous Ammonium Sulfate Solutions. Lysozyme and Bovine Serum Albumin (BSA), *J Solution Chem* **29**, 699–717.
197. Rivas, G., Fernández, J. A., & Minton, A. P. (2001) Direct observation of the enhancement of noncooperative protein self-assembly by macromolecular crowding: Indefinite linear self-association of bacterial cell division protein FtsZ, *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3150–3155.
198. Seeliger, J., Werkmüller, A., & Winter, R. (2013) Macromolecular Crowding as a Suppressor of Human IAPP Fibril Formation and Cytotoxicity, *PLoS ONE* **8**, e69652.
199. Uversky, V. N., Cooper, E. M., Bower, K. S., Li, J., & Fink, A. L. (2001) Accelerated α -synuclein fibrillation in crowded milieu, *FEBS Lett* **515**, 99–103.
200. Munishkina, L. A., Cooper, E. M., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2004) The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation, *J Mol Recognit* **17**, 456–464.
201. Munishkina, L. A., Ahmad, A., Fink, A. L., & Uversky, V. N. (2008) Guiding Protein Aggregation with Macromolecular Crowding, *Biochemistry* **47**, 8993–9006.
202. Hatters, D. M., Minton, A. P., & Howlett, G. J. (2002) Macromolecular Crowding Accelerates Amyloid Formation by Human Apolipoprotein C-II, *J Biol Chem* **277**, 7824–7830.
203. Ma, Q., Fan, J.-B., Zhou, Z., Zhou, B.-R., Meng, S.-R., Hu, J.-Y., Chen, J., & Liang, Y. (2012) The Contrasting Effect of Macromolecular Crowding on Amyloid Fibril Formation, *PLoS ONE* **7**, e36288.
204. Zhou, Z., Fan, J.-B., Zhu, H.-L., Shewmaker, F., Yan, X., Chen, X., Chen, J., Xiao, G.-F., Guo, L., & Liang, Y. (2009) Crowded Cell-like Environment Accelerates the Nucleation Step of Amyloidogenic Protein Misfolding, *J Biol Chem* **284**, 30148–30158.

-
205. Andrews, M. N., & Winter, R. (2011) Comparing the structural properties of human and rat islet amyloid polypeptide by MD computer simulations, *Biophys Chem* **156**, 43–50.
 206. Sellin, D., Yan, L.-M., Kapurniotu, A., & Winter, R. (2010) Suppression of IAPP fibrillation at anionic lipid membranes via IAPP-derived amyloid inhibitors and insulin., *Biophys Chem* **150**, 73–79.
 207. Sukenik, S., Politi, R., Ziserman, L., Danino, D., Friedler, A., & Harries, D. (2011) Crowding Alone Cannot Account for Cosolute Effect on Amyloid Aggregation, *PLoS ONE* **6**, e15608.
 208. Rosen, J., Kim, Y. C., & Mittal, J. (2011) Modest Protein-Crowder Attractive Interactions Can Counteract Enhancement of Protein Association by Intermolecular Excluded Volume Interactions, *J. Phys Chem B* **115**, 2683–2689.
 209. Zhang, D., Wu, L., Chen, J., & Liang, Y. (2012) Effects of macromolecular crowding on the structural stability of human α -lactalbumin, *Acta Biochim Biophys Sin* **44**, 703–711.
 210. Minton, A. P. (2013) Quantitative Assessment of the Relative Contributions of Steric Repulsion and Chemical Interactions to Macromolecular Crowding, *Biopolymers* **99**, 239–244.
 211. Yancey, P. H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, *J Exp Biol* **208**, 2819–2830.
 212. Oleinikova, A., Smolin, N., Brovchenko, I., Geiger, A., & Winter, R. (2005) Formation of Spanning Water Networks on Protein Surfaces via 2D Percolation Transition, *J Phys Chem B* **109**, 1988–1998.
 213. Smolin, N., & Winter, R. (2004) Molecular Dynamics Simulations of Staphylococcal Nuclease: Properties of Water at the Protein Surface, *J Phys Chem B* **108**, 15928–15937.
 214. Lin, T., & Timasheff, S. N. (1994) Thermodynamic Compensation of Urea and Trimethylamine N-Oxide Interactions, *Biochemistry* **33**, 12695–12701.
 215. Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001) Life in extreme environments, *Nature* **409**, 1092–1101.
 216. Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., & Somero, G. N. (1982) Living with Water stress: Evolution of Osmolyte Systems, *Science* **217**, 1214–1222.
 217. Levy-Sakin, M., Scherzer-Attali, R., & Gazit, E. (2012) Modifiers of Protein Aggregation — From Nonspecific to Specific Interactions. In *Protein and Peptide Folding, Misfolding, and Non-Folding* (Schweitzer-Stenner, R., Ed.), pp 441–478, Wiley, New Jersey.
 218. Bennion, B. J., & Daggett, V. (2004) Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: a chemical chaperone at atomic resolution, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6433–6438.
 219. Seeliger, J., Estel, K., Erwin, N., & Winter, R. (2013) Cosolvent effects on the fibrillation reaction of human IAPP, *Phys Chem Chem Phys* **15**, 8902–8907.

220. Gekko, K., & Timasheff, S. N. (1981) Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures, *Biochemistry* **20**, 4667–4676.
221. Canchi, D. R., Jayasimha, P., Rau, D. C., Makhatadze, G. I., & Garcia, A. E. (2012) Molecular Mechanism for the Preferential Exclusion of TMAO from Protein Surfaces, *J Phys Chem B* **116**, 12095–12104.
222. Schroer, M. A., Zhai, Y., Wieland, D. C. F., Sahle, C. J., Nase, J., Paulus, M., Tolan, M., & Winter, R. (2011) Exploring the Piezophilic Behavior of Natural Cosolvent Mixtures, *Angew Chem Int Ed* **50**, 11413–11416.
223. Bennion, B. J., & Daggett, V. (2003) The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5142–5147.
224. Zou, Q., Habermann-Rottinghaus, S. M., & Murphy, K. P. (1998) Urea Effects on Protein Stability: Hydrogen Bonding and the Hydrophobic Effect, *Proteins Struct Funct Genet* **31**, 107–115.
225. Panuszko, A., Bruździak, P., Zielkiewicz, J., Wyrzykowski, D., & Stangret, J. (2009) Effects of urea and trimethylamine-N-oxide on the properties of water and the secondary structure of hen egg white lysozyme, *J Phys Chem B* **113**, 14797–14809.
226. Paul, S., & Patey, G. N. (2007) Structure and Interaction in Aqueous Urea-Trimethylamine-N-oxide Solutions, *J Am Chem Soc* **129**, 4476–4482.
227. Wei, H., Fan, Y., & Gao, Y. Q. (2010) Effects of Urea, Tetramethyl Urea, and Trimethylamine N-Oxide on Aqueous Solution Structure and Solvation of Protein Backbones: A Molecular Dynamics Simulation Study, *J Phys Chem B* **114**, 557–568.
228. Kuffel, A., & Zielkiewicz, J. (2010) The hydrogen bond network structure within the hydration shell around simple osmolytes: urea, tetramethylurea, and trimethylamine-N-oxide, investigated using both a fixed charge and a polarizable water model, *J Chem Phys* **133**, 035102.
229. Meersman, F., Bowron, D., Soper, A. K., & Koch, M. H. J. (2009) Counteraction of urea by trimethylamine N-oxide is due to direct interaction, *Biophys J* **97**, 2559–2566.
230. Meersman, F., Bowron, D., Soper, A. K., & Koch, M. H. J. (2011) An X-ray and neutron scattering study of the equilibrium between trimethylamine N-oxide and urea in aqueous solution, *Phys Chem Chem Phys* **13**, 13765–13771.
231. Yamaguchi, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2006) Mechanism by Which the Amyloid-like Fibrils of a β 2-Microglobulin Fragment Are Induced by Fluorine-substituted Alcohols, *J Mol Biol* **363**, 279–288.
232. Wagner, J., Ryazanov, S., Leonov, A., Levin, J., Shi, S., Schmidt, F., Prix, C., Pan-Montojo, F., Bertsch, U., Mitteregger-Kretzschmar, G., Geissen, M., Eiden, M., Leidel, F., Hirschberger, T., Deeg, A. a, Krauth, J. J., Zinth, W., Tavan, P., Pilger, J., Zweckstetter, M., Frank, T., Bähr, M., Weishaupt, J. H., Uhr, M., Urlaub, H., Teichmann, U., Samwer, M., Bötzel, K., Groschup, M., Kretzschmar, H., Griesinger, C., & Giese, A. (2013) Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease, *Acta Neuropathol* **125**, 795–813.
233. Prusiner, S. B. (1998) Prions, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363–13383.

-
234. Collinge, J. (2001) Prion Diseases of Humans and Animals: Their Causes and Molecular Basis, *Annu Rev Neurosci* **24**, 519–550.
235. Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M., & Walsh, D. M. (2008) Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases, *Mol Med* **14**, 451–464.
236. Goedert, M. (2001) Alpha-Synuclein and Neurodegenerative Diseases, *Nat Rev Neurosci* **2**, 492–501.
237. Soto, C., & Estrada, L. D. (2008) Protein Misfolding and Neurodegeneration, *Arch Neurol* **65**, 184–189.
238. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., & Glabe, C. G. (2003) Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis, *Science* **300**, 486–489.
239. Bieschke, J., Herbst, M., Wiglenda, T., Friedrich, R. P., Boeddrich, A., Schiele, F., Kleckers, D., Lopez del Amo, J. M., Grüning, B. A., Wang, Q., Schmidt, M. R., Lurz, R., Anwyl, R., Schnoegl, S., Fändrich, M., Frank, R. F., Reif, B., Günther, S., Walsh, D. M., & Wanker, E. E. (2012) Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils, *Nat Chem Biol* **8**, 93–101.
240. Wittinghofer, A., & Pai, E. F. (1991) The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch, *Trends Biochem Sci* **16**, 382–387.
241. Bivona, T. G., & Philips, M. R. (2003) Ras pathway signaling on endomembranes, *Curr Opin Cell Biol* **15**, 136–142.
242. Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J. B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R. L., Cox, A. D., & Philips, M. R. (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi, *Nat Cell Biol* **4**, 343–350.
243. Bos, J. L. (1989) ras Oncogenes in Human Cancer : A Review, *Cancer Res* **49**, 4682–4689.
244. Willumsen, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G., & Lowy, D. R. (1984) The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association, *Nature* **310**, 583–586.
245. Hancock, J. F., Paterson, H., & Marshall, C. J. (1990) A Polybasic Domain or Palmitoylation Is Required in Addition to the CAAX Motif to Localize p21ras to the Plasma Membrane, *Cell* **63**, 133–139.
246. Wittinghofer, A., & Waldmann, H. (2000) Ras - A Molecular Switch Involved in Tumor Formation, *Angew Chem Int Ed* **39**, 4192–4214.
247. Hancock, J. F., & Parton, R. G. (2005) Ras plasma membrane signalling platforms, *Biochem J* **389**, 1–11.
248. Marshall, J. (1996) Ras effectors, *Curr Opin Cell Biol* **8**, 197–204.
249. Vogel, A., Reuther, G., Weise, K., Triola, G., Nikolaus, J., Tan, K.-T., Nowak, C., Herrmann, A., Waldmann, H., Winter, R., & Huster, D. (2009) The Lipid Modifications

- of Ras that Sense Membrane Environments and Induce Local Enrichment, *Angew Chem Int Ed* **48**, 8784–8787.
250. Abankwa, D., Gorfe, A. a, Inder, K., & Hancock, J. F. (2010) Ras membrane orientation and nanodomain localization generate isoform diversity, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1130–1135.
251. Abankwa, D., Gorfe, A. a, & Hancock, J. F. (2007) Ras nanoclusters: Molecular structure and assembly, *Semin Cell Dev Biol* **18**, 599–607.
252. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., & Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells, *Science* **296**, 913–916.
253. Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P. J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., & Bastiaens, P. I. H. (2005) An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms, *Science* **307**, 1746–1752.
254. Weise, K., Triola, G., Brunsveld, L., Waldmann, H., & Winter, R. (2009) Influence of the Lipidation Motif on the Partitioning and Association of N-Ras in Model Membrane Subdomains, *J Am Chem Soc* **131**, 1557–1564.
255. Weise, K., Kapoor, S., Denter, C., Nikolaus, J., Opitz, N., Koch, S., Triola, G., Herrmann, A., Waldmann, H., & Winter, R. (2011) Membrane-Mediated Induction and Sorting of K-Ras Microdomain Signaling Platforms, *J Am Chem Soc* **133**, 880–887.
256. Rajendran, L., & Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics, *J Cell Sci* **118**, 1099–1102.
257. Simons, K., & Ehehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J Clin Invest* **110**, 597–603.
258. García-Sáez, A. J., Chianti, S., & Schwille, P. (2007) Effect of Line Tension on the Lateral Organization of Lipid Membranes, *J Biol Chem* **282**, 33537–33544.
259. Kuzmin, P. I., Akimov, S. A., Chizmadzhev, Y. A., Zimmerberg, J., & Cohen, F. S. (2005) Line Tension and Interaction Energies of Membrane Rafts Calculated from Lipid Splay and Tilt, *Biophys J* **88**, 1120–1133.
260. Scott, R. E. (1976) Plasma Membrane Vesiculation : A New Technique for Isolation of Plasma Membranes, *Science* **194**, 743–745.
261. Scott, R. E., Perkins, R. G., Zschunke, M. A., Hoerl, B. J., & Maercklein, P. B. (1979) Plasma Membrane Vesiculation in 3T3 and SV3T3 Cells, *J Cell Sci* **35**, 229–243.
262. Sezgin, E., Kaiser, H.-J., Baumgart, T., Schwille, P., Simons, K., & Levental, I. (2012) Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles, *Nat Protoc* **7**, 1042–1051.
263. Baumgart, T., Hammond, A. T., Sengupta, P., Hess, S. T., Holowka, D. a, Baird, B. a, & Webb, W. W. (2007) Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3165–3170.

-
264. Sengupta, P., Hammond, A., Holowka, D., & Baird, B. (2008) Structural determinants for partitioning of lipids and proteins between coexisting fluid phases in giant plasma membrane vesicles, *Biochim Biophys Acta* **1778**, 20–32.
 265. Veatch, S. L., Cicuta, P., Sengupta, P., Honerkamp-Smith, A., Holowka, D., & Baird, B. (2008) Critical fluctuations in plasma membrane vesicles, *ACS Chem Biol* **3**, 287–293.
 266. Eccleston, E., Leonard, B. J., Lowe, J. S., & Welford, H. J. (1973) Basophilic Leukaemia in the Albino Rat and a Demonstration of the Basopietin, *Nature New Biol* **244**, 73–76.
 267. Passante, E., & Frankish, N. (2009) The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell, *Inflamm Res* **58**, 737–745.
 268. Reents, R., Wagner, M., Kuhlmann, J., & Waldmann, H. (2004) Synthesis and Application of Fluorescence-Labeled Ras-Proteins for Live-Cell Imaging, *Angew Chem Int Ed* **43**, 2711–2714.
 269. Van Meer, G. (1989) Lipid Traffic In Animal Cells, *Annu Rev Cell Biol* **5**, 247–275.
 270. Holthuis, J. C. M., & Levine, T. P. (2005) Lipid Traffic: Floppy Drives and A Superhighway, *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 209–220.
 271. Rinia, H. A., & De Kruijff, B. (2001) Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy, *FEBS Lett* **504**, 194–199.
 272. Brown, D. A., & London, E. (2000) Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts, *J Biol Chem* **275**, 17221–17224.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -CTF	α-C-terminales Fragment
α -Syn	α-Synuclein
β -CTF	β-C-terminales Fragment
A β	Amyloid β
ADL	<i>Apodized Dark Low</i>
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
anle138b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
anle138c	3-(3-Bromophenyl)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
anle145c	3-(3,5-Dibromophenyl)-5-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol Hydrobromid
anle186b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
anle197b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-iodophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
anle233b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
anle234b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(2-bromophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
anle236b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol
anle246b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3,5-dibromophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
anle253b	3-(3-Bromophenyl)-5-[4-(dimethylamino)phenyl]-1 <i>H</i> -pyrazol
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (<i>attenuated total reflection</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
Cer-PE	Ceramid-Phosphatidylethanolamin
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
Chol	Cholesterol
CLSM	konfokale Laserrastermikroskopie (<i>confocal laser scanning microscopy</i>)
CPE	Carboxypeptidase E
Cys	Cystein
DAC	7-Diethylaminocoumarin
DM	<i>Dark Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	1,2- Dioleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2- Dioleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phospho-(1'-<i>rac</i>-glycerol)
DPP	3,5- Diphenyl-pyrazol
DPPC	1,2- Dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2- Dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phospho-(1'-<i>rac</i>-glycerol)
DSM	Dihydrosphingomyelin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELWD	<i>Extra Long Working Distance</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ePC	etherverknüpftes Phosphatidylcholin
ePE	etherverknüpftes Phosphatidylethanolamin
ePS	etherverknüpftes Phosphatidylserin
ER	endoplasmatisches Retikulum
Far	F arnesyl
FCS	Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSD	F OURIER <i>self deconvolution</i>
FTIR	F OURIER-Transform- I nfrarot
FWHM	<i>full width at half-maximum</i>
GDP	G uanosindiphosphat
GPMV	<i>giant plasma membrane vesicle</i>
GTP	G uanosintriphosphat
GUV	riesige unilamellare Vesikel (<i>giant unilamellar vesicles</i>)
HD	H exadecyl
HEPES	2-(4-(2- H ydroxyethyl)-1- p iperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3- H exafluorisopropanol
hIAPP	h umanes I nsel- A myloid- P olypeptid
HVR	hypervariabler Bereich (<i>hypervariable region</i>)
IAPP	I nsel- A myloid- P olypeptid
IR	I nfrarot
IRE	internes R eflexionselement
ITO	<i>indium tin oxide</i>
Kr/Ar	K rypton/ A rgon
l_d	flüssig-ungeordnet (<i>liquid disordered</i>)
l_o	flüssig-geordnet (<i>liquid ordered</i>)
LPC	L ysophosphatidylcholin
LPE	L ysophosphatidylethanolamin
LUV	große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicles</i>)
MAS NMR	<i>magic angle spinning nuclear magnetic resonance</i>
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellur (<i>mercury cadmium telluride</i>)
mIAPP	M äuse- I nsel- A myloid- P olypeptid
MLV	m ultilamellare V esikel
NA	n umerische A pertur
NAD(P)H	Nicotinamidadeninukleotid(p hosphat), reduzierte Form
NBD	7- N itro b enz-2-oxa-1,3- d iazol
NBD-DHPE	<i>N</i> -(7- n itro b enz-2-oxa-1,3- d iazol-4-yl)-1,2- d ihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3- p hosphoethanolamin
<i>N</i> -Rh-DHPE	<i>N</i> -(Lissamine TM R hodamine B sulfonyl)-1,2- d ihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3- p hosphoethanolamin

OPD	<i>optical path differenz</i>
PA	Phosphorsäure (<i>phosphatidic acid</i>)
Pal	Palmitoyl
PAM	<i>peptidyl amidating monooxygenase</i>
PC	Phosphatidylcholin
PC	Prohormon Convertase
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
PrP	Prion-Protein
PrP ^C	<i>prion protein cellular</i>
PrP ^{Sc}	<i>prion protein scrapie</i>
PS	Phosphatidylserin
RAMP	Rezeptoraktivität-modifizierendes Protein (<i>receptor activity-modifying protein</i>)
RBL	<i>rat basophlic leukemia</i>
Rh	Lissamine TM Rhodamine B
rIAPP	Ratten-Insel-Amyloid-Polypeptid
SAP	Serum Amyloid P Komponente
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung (<i>Structure-activity relationship</i>)
sAPP α	α-sekretierten Amyloid-Precursor-Protein
sAPP β	β-sekretiertes Amyloid-Precursor-Protein
sery85	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(3-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
sery118	5-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)isoxazol
sery166a	2,4-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol Hydrobromid
sery255b	3-(3-Bromophenyl)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
sery297b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3,5-dichlorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
sery335b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-chlorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
sery339b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
sery344	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(2-chloro-5-hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
sery378b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(4-bromophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol
sery384	3-(4-Aminophenyl)-5-(3-bromophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol Hydrochlorid
sery392b	3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrazol
SM	Sphingomyelin
s _o	Gelphase (<i>solid ordered</i>)
STED	Stimulated Emission Depletion
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
ThT	Thioflavin T
TiSa	Titan:Saphir
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
Tricine-SDS-PAGE	<i>Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
UV/Vis	Ultraviolett/Sichtbar (visible)

v/v	<i>volume/volume</i>
VE	V olumeneinheit
w/v	<i>weight/volume</i>
w/w	<i>weight/weight</i>
WD	W orking D istance
WI	W ater <i>i</i> mmersion
WST-1	<i>water soluble tetrazolium 1, 4</i> -[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat
ZPD	<i>zero path differenz</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der trichterförmigen Energielandschaft der Proteinfaltung und –fehlfaltung.	3
Abbildung 1.2:	Schematische und molekulare Darstellung des Aufbaus einer amyloiden Fibrille.....	6
Abbildung 1.3:	Intrazelluläre Prozessierung des hIAPP in pankreatischen β -Zellen.	9
Abbildung 1.4:	Hypothese des zeitlichen Verlaufs der hIAPP-Fibrillenbildung und -ausbreitung.	12
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen der Membranpermeabilisierung durch hIAPP.	13
Abbildung 1.6:	Sequenzvergleich (<i>CLUSTAL O (1.1.1) multiple sequence alignment</i>) der Aminosäuresequenzen des IAPP in verschiedenen Säugetierspezies.	14
Abbildung 1.7:	Struktureller Aufbau von Phospholipiden, unterteilt in Glycerophospholipide und Phosphosphingolipide, und Sterolen.....	17
Abbildung 1.8:	Schematische Darstellung verschiedener lamellarer Lipidphasen.....	19
Abbildung 2.1:	Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der verwendeten eukaryotischen Zelllinie INS-1E.....	24
Abbildung 2.2:	Mechanismus der zellulären Reduktion des beim Zytotoxizitäts-Assay eingesetzten Tetrazoliums Salzes WST-1.	25
Abbildung 2.3:	Chloroform/Methanol/Wasser-Phasendiagramm in % (w/w) bei 20 °C.	26
Abbildung 2.4:	Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers.	34
Abbildung 2.5:	Schematische Darstellung des Aufbaus einer ATR-Messzelle.....	38
Abbildung 2.6:	Struktur und Bindung des ThT an amyloide Fibrillen.	44
Abbildung 2.7:	ThT als molekularer Rotor.....	45
Abbildung 2.8:	Schematische Darstellung des sigmoidalen Anstiegs der Fluoreszenzintensität des ThT während der Bildung amyloider Fibrillen.	45
Abbildung 2.9:	Amplitudenveränderung des Lichts beim Durchtritt durch ein Amplitudenobjekt in der Hellfeldmikroskopie.	48
Abbildung 2.10:	Optischer Aufbau eines Phasenkontrastmikroskopes.	48
Abbildung 2.11:	Amplitudenveränderung des Lichts beim Durchtritt durch ein Phasenobjekt in der Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie.....	49
Abbildung 2.12:	Vereinfachter schematischer Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops.	50
Abbildung 2.13:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterkraftmikroskops zur Messung im Nichtkontakt- oder <i>tapping</i> -Modus.....	53

Abbildung 2.14: Darstellung von Schwingungsamplitude und Phasenlage in der Nichtkontakt- und <i>tapping</i> -Modus-AFM.....	55
Abbildung 3.1: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der isolierten β -Zellmembran.....	61
Abbildung 3.2: Charakterisierung möglicher Phasenumwandlungen des isolierten β -Zellmembransystems.....	63
Abbildung 3.3: Rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der isolierten β -Zellmembran.....	63
Abbildung 3.4: Aggregationskinetiken des hIAPP in Anwesenheit verschiedener Membransysteme.....	65
Abbildung 3.5: Vergleich der Adsorptionskinetiken des hIAPP an verschiedenen Membransystemen.....	66
Abbildung 3.6: Zeitliche Veränderung der Sekundärstruktur des hIAPP in Folge der Aggregation an der isolierten β -Zellmembran.....	67
Abbildung 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Permeabilisierung der β -Zellmembran durch hIAPP.....	69
Abbildung 3.8: Vergleich der Primärstrukturen von hIAPP und A β 40 (bzw. A β 42).....	73
Abbildung 3.9: Nicht-amyloidogene und amyloidogene Prozessierung des APP durch α -, β - und γ -Sekretasen.....	73
Abbildung 3.10: Zeitliche Veränderung der Sekundärstruktur des A β in Folge der Aggregation an der isolierten β -Zellmembran in einer ATR-FTIR-Zelle bei 25 °C.....	75
Abbildung 3.11: Zeitliche Veränderung der Sekundärstruktur der äquimolaren hIAPP/A β -Mischung (je $c = 3 \mu\text{M}$) in Folge der Aggregation an der isolierten β -Zellmembran.....	77
Abbildung 3.12: Interaktion von 5 μM Fluorescein-A β (grün) mit <i>N</i> -Rh-DHPE-markierten GUV der isolierten β -Zellmembran (rot), die mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647 gefüllt sind (blau).....	79
Abbildung 3.13: Der Effekt einer Mischung aus hIAPP-K-BODIPY FL und Fluorescein-A β (je $c = 5 \mu\text{M}$; grün) auf Vesikel bestehend aus mit ATTO 647 (blau) gefüllten und mit <i>N</i> -Rh-DHPE markierten β -Zellmembranlipiden (rot).....	80
Abbildung 3.14: Lokalisation von hIAPP-K-BODIPY FL ($c = 5 \mu\text{M}$; grün) und DAC-A β ($c = 5 \mu\text{M}$; grau) in Anwesenheit von Vesikeln der β -Zellmembran.....	81
Abbildung 3.15: Zeitabhängige AFM-Aufnahmen der Aggregation von hIAPP + A β (je $c = 3 \mu\text{M}$) auf Glimmer.....	82
Abbildung 3.16: AFM-Aufnahmen der getrockneten Proben von 3 μM hIAPP (A), 3 μM hIAPP + 3 μM A β (B) und 3 μM A β (C) im Anschluss an deren Aggregation für 4 h, 24 h bzw. 72 h bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer auf Glimmer.....	83

Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des vermuteten Mechanismus der Kreuz- Interaktion und Heteroaggregatbildung von hIAPP und A β	85
Abbildung 3.18: Vorder- und rückseitige Ansicht der pentameren Struktur der Serum Amyloid P Komponente.	87
Abbildung 3.19: Aggregationskinetiken des hIAPP in Anwesenheit steigender Konzentrationen des SAP.	89
Abbildung 3.20: Aggregationskinetiken des hIAPP bei Zugabe einer äquimolaren Konzentration an SAP zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aggregation. ...	90
Abbildung 3.21: Molekulare Modelle des biologischen Crowdings.....	94
Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der molekularen Charakteristika verschiedener Crowdersysteme.....	95
Abbildung 3.23: Einfluss der Art des Crowders auf die Diffusion und Bindung von rIAPP.	96
Abbildung 3.24: Zeitabhängige Messungen der Fluoreszenzemission des ThT bei der Aggregation von hIAPP in äquimolarer Lösung mit unterschiedlichen Crowdern (je $c = 10 \mu\text{M}$).	98
Abbildung 3.25: Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzemission des ThT bei der Aggregation von hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Crowder-Lösungen von Ficoll (A), Dextran (B), BSA (C) und Lysozym (D) in Konzentrationen von 10-40% (w/v).....	99
Abbildung 3.26: Primäre (links) und flächennormierte (rechts) ATR-FTIR-Spektren der zeitabhängigen Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von reinem $10 \mu\text{M}$ hIAPP (A) und $10 \mu\text{M}$ hIAPP in einer Lösung von 20% (w/v) Ficoll (B) bzw. 20% (w/v) Dextran (C).	102
Abbildung 3.27: Verlauf der hIAPP-Aggregation in Crowder-Lösungen für die anschließende Untersuchung mittels AFM.	103
Abbildung 3.28: AFM-Aufnahmen der Strukturen von $50 \mu\text{M}$ hIAPP nach ~ 15 h Inkubation in Lösung in An- und Abwesenheit von Crowdern.	105
Abbildung 3.29: Effekt des Crowdings auf die Zytotoxizität des hIAPP.	106
Abbildung 3.30: Einfluss des Crowdings auf die Aggregation des hIAPP an der isolierten β -Zellmembran.	107
Abbildung 3.31: Konkurrierende Reaktionswege bei der Aggregation des hIAPP im Crowding.	110
Abbildung 3.32: Molekulare Strukturen der Osmolyte TMAO, Betain und Harnstoff.	112
Abbildung 3.33: Zeitabhängige relative Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation von $10 \mu\text{M}$ hIAPP in Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen und Verhältnissen von Harnstoff (A), TMAO (B), Betain (C), TMAO + Harnstoff (D) und Betain + Harnstoff (E).	113

Abbildung 3.34: AFM-Aufnahmen der fibrillären Strukturen des hIAPP ($c = 50 \mu\text{M}$) nach 15 h Inkubation in An- und Abwesenheit der Kosolvenzien TMAO und Harnstoff.	115
Abbildung 3.35: Flächennormierte ATR-FTIR-Spektren der zeitabhängigen Verschiebung der Amid-I'-Bande des hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) allein (A), in Lösung mit TMAO (B), ^{13}C -Harnstoff (C) und beiden Kosolvenzien (D).	116
Abbildung 3.36: Schematische Darstellung des Screeningverfahrens zur Entwicklung des molekularen Inhibitors anle138b.	120
Abbildung 3.37: Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensitäten (A) und finale Fluoreszenzintensitäten (B) des ThT während der Aggregation von $10 \mu\text{M}$ hIAPP in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ potentieller Inhibitor-moleküle.	122
Abbildung 3.38: Finale Fluoreszenzintensitäten des ThT während der Aggregation von $10 \mu\text{M}$ hIAPP in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen ($0,1$ - $20 \mu\text{M}$) ausgewählter potentieller Inhibitormoleküle.	123
Abbildung A.1: Repräsentative Darstellung der Bandenanpassung zweier flächennormierter Amid-I'-Banden des hIAPP ($c = 3 \mu\text{M}$) während der Inkubation an einer Membran der isolierten β -Zellmembranlipide zu Beginn bei $t = 5 \text{ min}$ (A) und nach abgeschlossener Aggregation bei $t = 40 \text{ h}$ (B).	135
Abbildung A.2: AFM-Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aggregation von $3 \mu\text{M}$ hIAPP (A), je $3 \mu\text{M}$ hIAPP + A β (B) und $3 \mu\text{M}$ A β (C) in Puffer ($10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4) auf Glimmer bei Raumtemperatur.	136
Abbildung A.3: Primäre (links) und flächennormierte (rechts) ATR-FTIR-Spektren der zeitabhängigen Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von $10 \mu\text{M}$ SAP allein (A) und einer Mischung aus $10 \mu\text{M}$ hIAPP und $10 \mu\text{M}$ SAP (B) sowie $10 \mu\text{M}$ hIAPP und $5 \mu\text{M}$ SAP (C).	137
Abbildung A.4: Zeitabhängige relative Fluoreszenzintensität des ThT während der Aggregation von $10 \mu\text{M}$ hIAPP in Anwesenheit verschiedener Inhibitormoleküle in unterschiedlichen Konzentrationen.	140
Abbildung A.5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur und der spezifischen Membrananker der Ras-Isoformen.	141
Abbildung A.6: Schematische Darstellung des Prozesses der GPMV-Gewinnung.	144
Abbildung A.7: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu unterschiedlichen Stadien der GPMV-Isolation aus RBL-2H3-Zellen.	148
Abbildung A.8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der isolierten GPMV-Lipidextrakte.	149
Abbildung A.9: Charakterisierung möglicher Phasenumwandlungen der isolierten GPMV-Lipidextrakte.	151

Abbildung A.10: Temperaturabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUV bestehend aus isolierten GPMV-Lipidextrakten.	152
Abbildung A.11: AFM-Aufnahme der GPMV-Lipidextrakte auf Glimmer bei Raumtemperatur.	153
Abbildung A.12: Temperaturabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der isolierten GPMV.	154
Abbildung A.13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der zeitabhängigen Interaktion von 2 μ M BODIPY FL-N-Ras HD/Far (GDP) (grün) mit GUV bestehend aus GPMV-Lipidextrakten, die mit <i>N</i> -Rh-DHPE (rot, $c = 0,2$ mol%) markiert sind.	155

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1:	Zelllinien und Zellkulturreagenzien.....	23
Tabelle 2.2:	Peptide und Proteine	32
Tabelle 2.3:	IR-Banden der CH-Streckschwingungen von Phospholipiden.....	37
Tabelle 2.4:	Gewählte Einstellungen des Spektrometers zur <i>T</i> -abhängigen Transmissions-FTIR-Spektroskopie	37
Tabelle 2.5:	Zuordnung der Wellenzahlbereiche zu den Sekundärstrukturmotiven der Peptide/Proteine in D ₂ O.....	40
Tabelle 2.6:	Gewählte Einstellungen des Spektrometers bei der ATR-FTIR- Spektroskopie	42
Tabelle 2.7:	Gewählte fluoreszenzmikroskopische Einstellungen	52
Tabelle 3.1:	Ergebnisse der Quantifizierung des Lipid- und Proteingehaltes.....	60
Tabelle 3.2:	Dauer der lag-Phasen, t_{lag} , und apparente Wachstumskonstanten, k_{app} , der Aggregation des hIAPP in Anwesenheit von Vesikeln verschiedener Zusammensetzung	65
Tabelle 3.3:	Dauer der lag-Phasen, t_{lag} , apparente Wachstumskonstanten, k_{app} , und maximale Fluoreszenzintensitäten des ThT, I_f , bei der Aggregation des hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Lösung mit unterschiedlichen Arten und Konzentrationen an Crowdern.....	100
Tabelle 3.4:	Auswertung der Aggregationskurven des hIAPP ($c = 10 \mu\text{M}$) in Anwesenheit potentieller Inhibitormoleküle ($c = 0,1-20 \mu\text{M}$) bezüglich t_{lag} , k_{app} und I_f	124
Tabelle A.1:	Abhängigkeit der lateralen Diffusionskonstante, D , des rIAPP-K- BODIPY FL ($c = 10 \mu\text{M}$) von der Konzentration der Crowder Ficoll, Dextran, BSA und Lysozym (je $10 \mu\text{M}$ bis 40% (w/v)) gemessen mittels FCS	138
Tabelle A.2:	Höhe der mittels AFM detektierten hIAPP-Fibrillen und Oligomere.....	138
Tabelle A.3:	Höhe der mittels AFM detektierten hIAPP-Fibrillen.....	139
Tabelle A.4:	Gewählte Einstellungen der Spektrometer zur <i>T</i> -abhängigen Transmissions-FTIR-Spektroskopie	147
Tabelle A.5:	Ergebnisse der Quantifizierung des Lipid- und Proteingehaltes.....	149

VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen

1. **Seeliger, J.**, Werkmüller, A., & Winter, R. (2013) Macromolecular Crowding as a Suppressor of Human IAPP Fibril Formation and Cytotoxicity, *PLoS ONE* **8**, e69652.
2. **Seeliger, J.**, Estel, K., Erwin, N., & Winter, R. (2013) Cosolvent effects on the fibrillation reaction of human IAPP, *Phys Chem Chem Phys* **15**, 8902–8907.
3. **Seeliger, J.**, & Winter, R. (2012) Islet Amyloid Polypeptide: Aggregation and Fibrillogenesis *in vitro* and Its Inhibition. In *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease* (Harris, J. R., Ed.), pp 185–209, Springer Netherlands, Dordrecht.
4. Marchan, R., Lesjak, M. S., Stewart, J. D., Winter, R., **Seeliger, J.**, & Hengstler, J. G. (2012) Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 links the tumor metabolome to signaling network activities, *Cell Cycle* **11**, 4499–4506.
5. **Seeliger, J.**, Weise, K., Opitz, N., & Winter, R. (2012) The Effect of A β on IAPP Aggregation in the Presence of an Isolated β -Cell Membrane, *J Mol Biol* **421**, 348–363.
6. **Seeliger, J.**, Evers, F., Jeworrek, C., Kapoor, S., Weise, K., Andreetto, E., Tolan, M., Kapurniotu, A., & Winter, R. (2012) Cross-Amyloid Interaction of A β and IAPP at Lipid Membranes, *Angew Chem Int Ed* **51**, 679–683.
7. Bartlett, S., **Seeliger, J.**, & Burnell, J. N. (2012) Identification of critical residues in the bifunctional phosphoenolpyruvate synthetase kinase phosphotransferase of *Escherichia coli*, *Curr Top Biochem Res* **14**, 77–83.
8. Weise, K., Mishra, R., Jha, S., Sellin, D., Radovan, D., Gohlke, A., Jeworrek, C., **Seeliger, J.**, Möbitz, S., & Winter, R. (2011) Interaction of hIAPP and Its Precursors with Model and Biological Membranes. In *Lipids and Cellular Membranes in Amyloid Diseases* (Jelinek, R., Ed.), pp 93–120, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
9. Yu, S., Jensen, V., **Seeliger, J.**, Feldmann, I., Weber, S., Schleicher, E., Häussler, S., & Blankenfeldt, W. (2009) Structure Elucidation and Preliminary Assessment of Hydrolase Activity of PqsE, the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Response Protein, *Biochemistry* **48**, 10298–10307.

Konferenzbeiträge

1. Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (9.–11. Mai 2013), Karlsruhe, Deutschland – **Vortrag**
2. Biophysical Society Meeting (2.–6. Februar 2013), Philadelphia, Pennsylvania, USA – **Poster**
3. Tagung der *International Max Planck Research School in Chemical Biology* (29. Oktober – 1. November 2012), Merseburg, Deutschland – **Vortrag**
4. Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (17.–19. Mai 2012), Leipzig, Deutschland – **Poster**
5. Biophysical Society Meeting (25.–29. Februar 2012), San Diego, Kalifornien, USA – **Poster**
6. Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (03. Februar 2012), Dortmund, Deutschland – **Poster**
7. Konferenz *Amyloid Fibrils, Prions and Precursors: Molecules for Targeted Intervention* (25.–28. August 2011), Halle (Saale), Deutschland – **Poster**
8. Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (2.–4. Juni 2011), Berlin, Deutschland – **Vortrag**
9. *Utrecht University and IMPRS Joint Symposium on Chemical Biology* (23.–25. Mai 2011), Utrecht, Niederlande – **Poster**
10. Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (04. Februar 2011), Dortmund, Deutschland – **Vortrag**

ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

