

Zusammenfassung

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

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

Einfluss von Cosolventien auf das Aggregationsverhalten von Insulin

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

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

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

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

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

Einfluss von Druck auf das Aggregationsverhalten von Insulin

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

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

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

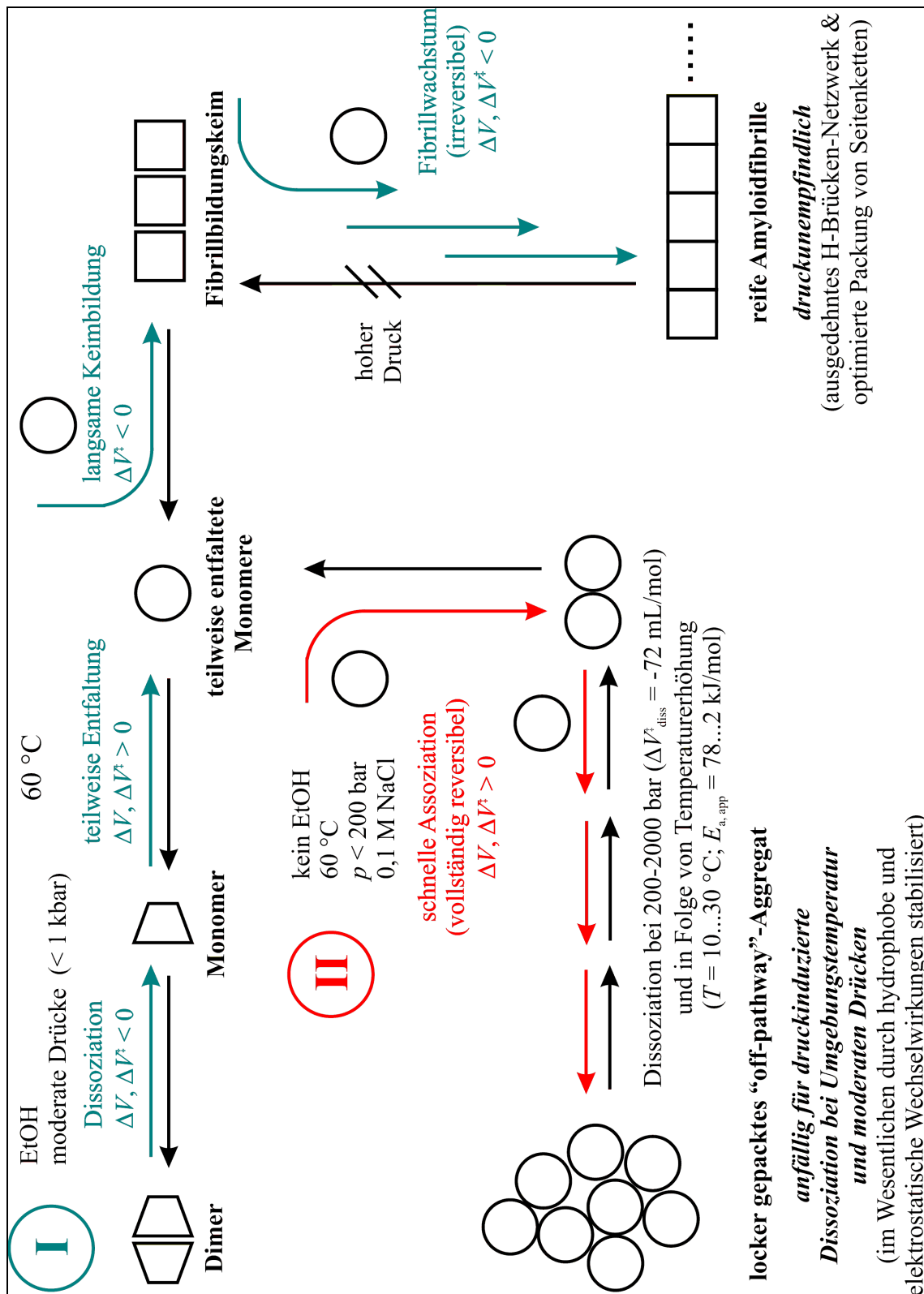


Abbildung 1: Vereinfachtes hypothetisches Schema zum Einfluss von Temperatur, Druck und Cosolvenszusatz auf die Aggregations- und Fibrillbildungspfade von Insulin. (I) Fibrillbildungspfad (blau); (II) alternativer, reversibler „off pathway“.

Einfluss von Modellbiomembranen auf das Aggregationsverhalten von Insulin

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

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

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

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

Schlagworte

