

Biochemische Charakterisierung der Wirkung peptidischer Inhibitoren auf die Aggregation der amyloidogenen Peptide Inselamyloid Polypeptid (IAPP), Amyloid- β -Peptid (A β) und Insulin

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Ingenieurin (FH)
Aleksandra Velkova

aus Nürtingen

Berichter/in: Universitätsprofessorin Dr. Aphrodite Kapurniotu
Universitätsprofessor. Dr. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Proteine</i>	2
1.1.1	Proteinstruktur	2
1.1.2	Von der Primärsequenz zur funktionellen 3-D-Struktur	5
1.2	<i>Aggregation von Proteinen zu Amyloidfibrillen</i>	9
1.2.1	Mechanismen der amyloiden Fibrillenbildung	11
1.2.2	Die Charakterisierung und Ausbildung amyloider Fibrillen	12
1.2.3	Bedeutung der oligomeren Strukturen und Protofilamente	15
1.2.4	Entdeckung von Kernsequenzen	16
1.3	<i>Typ II Diabetes</i>	18
1.3.1	Physiologische Funktion und Aggregation von Inselamyloid Polypeptid	18
1.3.2	Design von Inhibitoren der zytotoxischen IAPP-Aggregation	22
1.4	<i>Alzheimer-Erkrankung</i>	25
1.4.1	Amyloid- β -Peptid	26
1.4.2	Die Amyloid-Kaskade-Hypothese und der Einfluss genetischer Faktoren	29
1.4.3	Therapie	30
1.5	<i>Insulin-Aggregation</i>	31
1.5.1	Biosynthese und Struktur des Insulins	32
1.5.2	Bildung von präfibrillären Strukturen und Amyloidfibrillen	34
1.6	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	36
2	Material und Methoden	37
2.1	<i>Chemikalien</i>	37
2.2	<i>Peptide</i>	39
2.2.1	Kommerziell erworbene und in der Arbeitsgruppe synthetisierte Peptide	39
2.2.2	Peptidsynthese	40
2.2.3	Fluoreszenzmarkierung von Peptiden	41
2.2.4	Biotinylierung von IAPP-GI	42
2.2.5	Aufreinigung und Charakterisierung der Peptide	43
2.2.6	Lyophilisation von Proteinlösungen	44
2.3	<i>Zellkultur</i>	44
2.3.1	Kultivierung der Zellen	44
2.3.2	Zellzählung	45

2.3.3	Durchführung der Zelltoxizitäts-Assay	45
2.3.4	Insulin vermittelte Signaltransduktion	47
2.4	<i>Biochemische Methoden</i>	48
2.4.1	Bestimmung der Zellvitalität durch MTT-Reduktion	48
2.4.2	Messung der zellulären Apoptoserate mittels ELISA	49
2.4.3	Thioflavin T-Assay	49
2.5	<i>Spektroskopische Methoden</i>	51
2.5.1	UV/Vis-Spektroskopie	51
2.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	52
2.5.3	CD-Spektroskopie	56
2.5.4	Immunogoldmarkierung	58
2.5.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	59
2.6	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	60
2.6.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	60
2.6.2	Crosslinking von Homo- und Heterokomplexe durch Glutardialdehyd	61
2.6.3	Biotin-pull-down-Assay	62
2.6.4	Insulin-Oligomerisierungs Assay	63
2.6.5	Immunpräzipitation	64
2.6.6	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)	64
2.6.7	Western-Blotting	65
2.6.8	Silberfärbung	67
3	Ergebnisse	69
3.1	<i>Selbst- und Heteroassoziation von IAPP und den IAPP-Analoga</i>	69
3.2	<i>Inhibierung der Aβ(1-40)-Aggregation zu zelltoxischen Spezies durch die Interaktion mit den IAPP-Analoga</i>	79
3.2.1	Hemmung des durch A β (1-40) vermittelten Zelltods	79
3.2.2	Unterbindung der A β (1-40)-Fibrillenbildung durch IAPP-GI	83
3.2.3	Charakterisierung der Selbstassoziation von A β (1-40) und Hetero-assoziation mit den IAPP-Analoga	84
3.2.4	FRET-Messungen zur Untersuchung der A β (1-40)/IAPP-GI- bzw. A β (1-40)/IAPP-Interaktion	90
3.2.5	Nachweis der IAPP-GI/A β (1-40)-Interaktion unter Anwendung des Biotin-pull-down-Assays	94
3.2.6	Stabilität der A β (1-40)/IAPP-GI- und A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe	97
3.2.7	Nachweis der Heteroaggregate von IAPP-GI mit A β (1-40) durch Crosslinking	104

3.2.8	Nachweis der A β (1-40)/IAPP-GI- und A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe mittels Immunogoldmarkierung	105
3.3	<i>Untersuchung der Wechselwirkung von IAPP-GI mit Aβ(1-42)</i>	107
3.3.1	Effekt von IAPP-GI auf die Selbstassoziation von A β (1-42) zu toxischen Aggregaten	107
3.3.2	Bindung von A β (1-42) an IAPP-GI	108
3.3.3	Nachweis der A β (1-42)/IAPP-GI-Heteroaggregate durch Crosslinking	112
3.4	<i>Einfluss der IAPP-Analoga und von IAPP auf die Bildung von Insulinfibrillen und zytotoxischen Aggregaten</i>	113
3.4.1	Hemmung der Insulinaggregation zu Fibrillen	113
3.4.2	Effekte der IAPP-Analoga, IAPP, rIAPP und NFGAIL-GI auf die Bildung von toxischen Insulinspezies	117
3.4.3	Bindungsstudien mittels Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektroskopie	126
3.4.4	Nachweis der Insulin/IAPP-GI-Heterokomplexe durch Crosslinking	131
3.4.5	Hemmung der nicht-fibrillären Insulin-Oligomerisierung durch IAPP-GI und IAPP	133
3.4.6	Auflösung der Insulinfibrillen und -oligomere durch IAPP-GI	135
3.4.7	Effekt von IAPP-GI auf die Bioaktivität von Insulin	137
4	Diskussion	140
4.1	<i>Untersuchung der Selbst- und Heteroassoziation von IAPP und der IAPP-Analoga mittels Fluoreszenzspektroskopie</i>	140
4.2	<i>Wechselwirkung mit Aβ(1-40) und Effekte der IAPP-Analoga auf die Aβ(1-40)-Aggregation zu zelltoxischen Spezies und Fibrillen</i>	143
4.3	<i>Wechselwirkung von IAPP-GI mit Aβ(1-42) und Effekte auf die zytotoxischen Aβ(1-42)-Aggregation</i>	152
4.4	<i>Wechselwirkung von IAPP und den IAPP-Analoga mit Insulin und ihre Auswirkung auf die toxische Insulinaggregation, Fibrillogenese und Bioaktivität</i>	154
5	Zusammenfassung	161
6	Literaturverzeichnis	164

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
Aβ	Amyloid-β-Peptid
AD	Alzheimer-Demenz
ADDLs	<i>Amyloid-beta Derived Diffusible Ligands</i>
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variance</i>)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
BACE	Beta-Stelle-APP-Spaltenden Enzyms, β-Sekretase (<i>Beta-site APP-Cleaving Enzyme</i>)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	Circulardichroismus
DAC	7-Diethylaminocoumarin-3-Carbonsäure
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAD	Familiäre Alzheimer-Demenz
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
HFIP	Hexafluorisopropanol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IgG	Immunglobulin G
IAPP	Inselamyloid Polypeptid

hIAPP	Humanes Inselamyloid Polypeptid
rIAPP	Ratten Inselamyloid Polypeptid
IP	Immunopräzipitation
IR	Insulinrezeptor
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
LDS	<i>Lauryl Dodecyl Sulfate</i>
MTT	4,5-(Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
NSB	nicht-spezifische Bindung
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>per analysis</i>
PTH	Parathyroidhormon
PC-12	Phäochromozytom Zelllinie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
POD	Peroxidase
RIN	Ratten-Insulinomazelllinie
RT	Raumtemperatur
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
TBTU	2-(1 H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyl-Uronium Tetrafluorborat
ThT	Thioflavin T
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
WB	Western Blot

1 Einleitung

Verbesserungen der Lebensverhältnisse, besonders die Fortschritte in der Medizin, haben in den reichen Industrieländern dazu geführt, dass die Menschen im Durchschnitt immer älter werden. In zwanzig Jahren wird bis zu einem Drittel der Bevölkerung in den OECD-Staaten über 65 Jahre alt sein [1]. In der ständig wachsenden Gruppe der Hochbetagten nehmen Krankheiten, chronische Beschwerden und körperliche Leiden rasch zu. Besonders dramatisch ist der Anstieg der neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Typ II Diabetes, für die es bisher keine Heilung gibt.

Ein Abknicken des in den letzten fünfzig Jahren beobachteten Trends zur Verlängerung der Lebensspanne ist bisher nicht festzustellen. Die Häufigkeit degenerativer Krankheiten wird sich somit weiter erhöhen. Sie liegt in Europa und den USA für die Alzheimer-Demenz gegenwärtig bei 1 bis 1,5 Prozent der Bevölkerung [2]. Die Kosten für die Gesellschaft sind enorm. Allein für die etwa fünf Millionen Alzheimer-Patienten in Europa werden Gesamtkosten von 50 Milliarden Euro pro Jahr veranschlagt [2].

Seit der Entdeckung, dass die Missfaltung und Aggregation körpereigener Proteine im Zusammenhang mit der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung und des Typ II Diabetes stehen, beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Erforschung der molekularen Grundlagen dieser Krankheiten. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur die altersbedingten Demenzerkrankungen und der Typ II Diabetes, sondern eine hohe Anzahl an humanen Krankheiten wie z.B. Parkinson oder Prion-Erkrankungen mit Proteinaggregationen zusammenhängen, die mit dem Absterben von Zellen in Geweben und Organen in Verbindung gebracht werden.

Die Entwicklung vielversprechender Therapieansätze gibt nicht nur die Hoffnung, in einer Gesellschaft des langen Lebens gesünder älter zu werden, sondern würde auch zu einer deutlichen Entlastung der Gesundheits- und Sozialsysteme führen.

Die nächsten Abschnitte befassen sich zunächst mit den Grundlagen der Faltung und Aggregation von Proteinen. Sie geben einen Überblick über die Vielzahl der Proteinfehlfaltungskrankheiten und fassen die molekularen Gemeinsamkeiten dieser Erkrankungen zusammen. Näher beschrieben werden vor allem die Peptide, deren Missfaltung und Aggregation zur Alzheimer Erkrankung und Typ II Diabetes führt, und die des Insulins, dessen Aggregation eine große Problematik bei der Produktion und vor allem dessen therapeutischer Anwendung darstellt. Die Untersuchung der Aggregationsprozesse dieser Moleküle, vor allem deren Unterbindung durch Inhibitoren, stellt das Thema dieser Doktorarbeit dar.

1.1 Proteine

Die in den Genen enthaltene Information wird von Proteinen in zelluläre Abläufe und Strukturen wiedergegeben. Sie haben bei allen Lebensprozessen eine Hauptrolle: Proteine regulieren die Gen-Expression, transportieren kleine Moleküle, wirken als Rezeptoren und Botenstoffe bei der Signalweiterleitung, bilden das Gerüst jeder einzelnen Zelle, beschleunigen biochemische Reaktionen und sind an der Immunabwehr beteiligt. Trotz der Vielfalt an Aufgaben bestehen alle Proteine aus nur 20 verschiedenen Bausteinen, den proteinogenen Aminosäuren. Die einzelnen Aminosäuren werden über Peptidbindungen zu einer linearen Polypeptidkette verbunden. Ketten, die aus weniger als 100 Aminosäuren aufgebaut sind bezeichnet man als Polypeptide. Jedes Protein hat seine einzigartige Aminosäuresequenz, welche die dreidimensionale Form und damit seine Funktion bestimmt.

1.1.1 Proteinstruktur

Für die Wirkungsweise der Proteine ist die korrekte Faltung zu ihrer nativen Struktur besonders wichtig. Die räumliche Anordnung entsteht durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Atomen des Polypeptidgerüsts und Bindungen zwischen den Aminosäureseitenketten. Proteinstrukturen lassen sich auf vier Ebenen betrachten und werden in Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur unterteilt (Abbildung 1.4). Als Primärstruktur wird die Aminosäuresequenz einer Polypeptidkette bezeichnet. Aminosäuresequenzen falten sich lokal zu Sekundärstrukturen. Die Zahl der Konformationen, die eine Peptidkette einnehmen kann, wird durch den Doppelbindungs-charakter der Peptidbindung begrenzt [3]. Sie ist starr, d. h. die Rotation um diese Bindung wird verhindert, was zu einer Planarität der Peptidbindung führt (Abbildung 1.1).

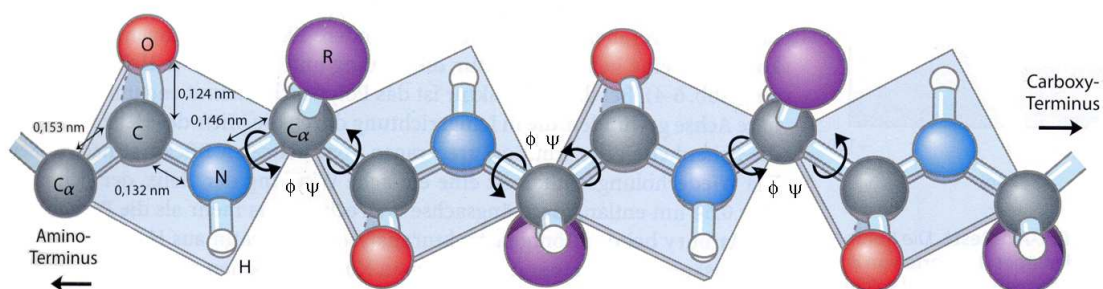


Abbildung 1.1: Peptidbindungen haben eine planare trans-Konfiguration. Sechs Atome (C_α, C, O, N, H, C_α) zweier verbundener Aminosäuren liegen in einer Ebene. Die C-N-Bindung ist nicht frei drehbar. Dagegen können sich die N-C_α- und die C_α-C-Bindungen drehen, wobei die resultierenden Bindungswinkel als φ und ψ bezeichnet werden. Quelle [3].

Dagegen sind Rotationen um die C_α-Atome möglich. Die Bindungswinkel für die N-C_α und C_α-C-Bindung werden mit φ (phi) und ψ (psi) bezeichnet. Hierbei können φ und ψ Winkel zwischen -180° und +180° einnehmen. Jedoch sind viele Werte wegen sterischer Hinderung

zwischen den Atomen im Polypeptidrückgrat und in den Aminosäureseitenketten ausgeschlossen [3]. Aufgrund solcher sterischen Kollisionen, die auch im Falle der cis-Konfiguration einer Polypeptidkette vorkommen, wird die trans-Form bevorzugt.

Durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonyl-Sauerstoffatomen und den Amid-Stickstoffen im Polypeptidrückgrat entstehen vorzugsweise zwei Sekundärstrukturen: die α -Helix und das β -Faltblatt (parallel und antiparallel). Zwischen diesen Sekundärstrukturelementen werden verschiedene Schleifen (turns) ausgebildet, die die Richtung einer Polypeptidkette umkehren.

Bei einer α -helikalen Sekundärstruktur ist die Peptidkette schraubenartig zu einem Zylinder gewunden (Abbildung 1.2). Die Struktur wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den N-H- und C=O-Gruppe der Hauptkette stabilisiert, indem die CO-Gruppe jeder Aminosäure eine Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe jener Aminosäure, die in der linearen Sequenz vier Reste weiter liegt, bildet [4]. Auf diese Weise entsteht eine gleichmäßige Helix mit 3,6 Aminosäuren pro Windung. Jede Windung der Helix ist über 3-4 Wasserstoffbrücken an die vorausgegangene Windung gebunden. Die Seitenketten zeigen bei dieser Anordnung nach außen.

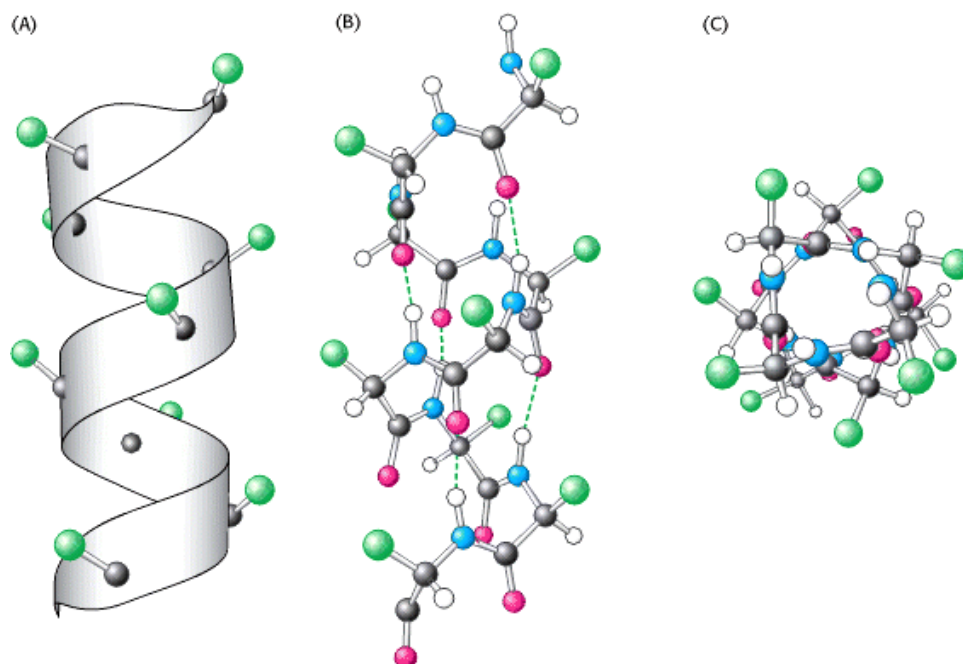


Abbildung 1.2: Struktur der α -Helix. (A) Schematische Darstellung durch ein Bänderdiagramm (α -Kohlenstoffatome: graue Kugeln, Aminosäureseitenketten: grüne Kugeln). (B) Kugel-Stab-Modell mit Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linie) zwischen NH- und CO-Gruppen. (C) Draufsicht einer α -Helix zur Veranschaulichung des gewundenen Rückgrats. Quelle [4].

Das β -Faltblatt ist neben der α -Helix eine weitere häufige Sekundärstruktur. β -Stränge sind an den $C\alpha$ -Atomen gefaltet und haben eine zickzackartige Anordnung. Auch hier sind Wasserstoffbrücken für die Struktur verantwortlich. Während bei einer α -Helix benachbarte Aminosäuren innerhalb der Helix Wasserstoffbrücken ausbilden, sind es bei Faltblatt-

Strukturen die CO- und NH-Gruppen benachbarter β -Stränge. Diese β -Stränge können entweder parallel (in derselben Richtung) oder antiparallel (in entgegengesetzter Richtung) verlaufen [4] (Abbildung 1.3). Die Richtungsänderung erfolgt durch die Ausbildung einer β -Schleife. Während die α -Helix gewunden ist, weist das β -Faltblatt eine flache Struktur auf und die Polypeptidkette ist fast komplett gestreckt. Die Seitenketten benachbarter Aminosäuren stehen abwechselnd nach beiden Seiten senkrecht aus der Faltblattebene heraus.

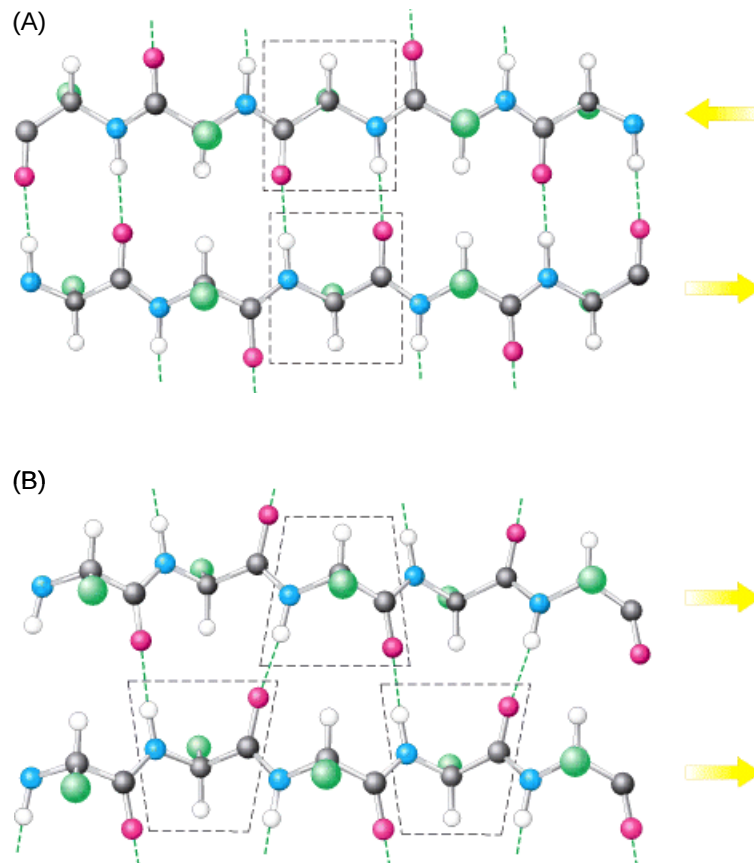


Abbildung 1.3: Antiparalleles und paralleles β -Faltblatt. (A) Die Laufrichtung benachbarter β -Stränge ist entgegengesetzt. Jede Aminosäure (grau gestricheltes Kästchen) bildet Wasserstoffbrücken (grün gestrichelt) mit einer anderen auf dem benachbarten Strang. (B) Die benachbarten β -Stränge verlaufen in die gleiche Richtung. Wasserstoffbrücken verbinden jede Aminosäure auf einem Strang mit je zwei Aminosäuren auf dem Nachbarstrang. Quelle [4].

Die dreidimensionale Anordnung aller Atome in einem Protein wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Darin können helikale Abschnitte, Faltblatt-Strukturen und Schleifen vorkommen. Diese Struktur wird durch H-Brücken, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen zwischen den Aminosäureseitenketten stabilisiert. Durch Disulfidbrücken können in der Sequenz voneinander entfernte Bereiche einer Polypeptidkette kovalent verbunden werden. Eine Quartärstruktur entsteht durch Assoziation mehrerer gefalteter Polypeptidketten. Sie gibt an aus welchen und wie vielen solcher Untereinheiten ein Protein besteht und beschreibt wie diese räumlich zueinander orientiert sind.

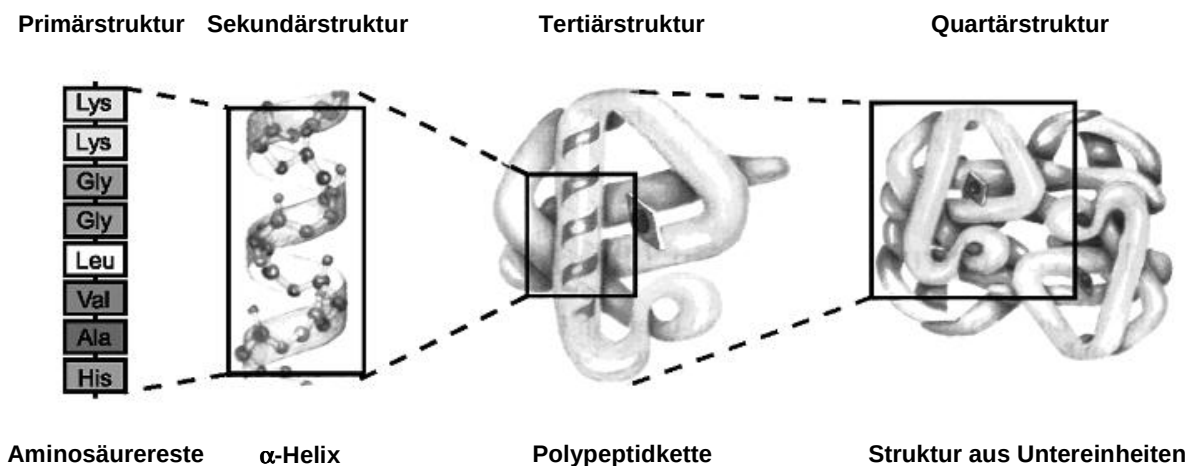


Abbildung 1.4: Die vier Strukturebenen der Peptide und Proteine. [Lehninger: Prinzipien der Biochemie]
Die Primärstruktur entspricht der Aminosäuresequenz. Als eine der möglichen Sekundärstrukturen ist die α -Helix abgebildet, welche einen Teil der Tertiärstruktur des gefalteten Proteins bildet und eine Untereinheit in der Quartärstruktur darstellt. Quelle [4].

1.1.2 Von der Primärsequenz zur funktionellen 3-D-Struktur

Trotz ihrer molekularen Diversität haben alle Proteine dieselbe Eigenschaft, sich schnell und spontan zu einer wohldefinierten räumlichen Struktur zu falten, die entscheidend für ihre spezifische Funktion ist. Wie diese molekulare Meisterleistung erreicht wird ist eine faszinierende, aber immer noch unbeantwortete Frage. Christian Anfinsen zeigte bereits in den 1960er Jahren mit der Denaturierung und Renaturierung von Ribonuclease, dass die Proteinfaltung spontan abläuft, und die native Form eines Proteins die thermodynamisch stabilste Struktur ist [5]. Er postulierte, dass die Information für die Faltung zur nativen Struktur allein in der Aminosäuresequenz codiert ist [5]. Sollten sich Proteine nach einem zufälligen Prozess falten, d. h. alle infrage kommenden Konformationen ausprobieren, bis man die energetisch günstigste gefunden hat, würde ein Protein welches aus 100 Aminosäureresten besteht, erst nach etwa 10^{26} Jahren seine richtige dreidimensionale Struktur finden [6]. Aus *in vitro* Studien ist bekannt, dass die Proteinfaltung in einem Zeitraum von Mikrosekunden bis Millisekunden abläuft [7]. Dies führte zu der Annahme, dass die Proteinfaltung zielgerichtet auf definierte Wege mit teilgefalteten Zwischenstufen verlaufen muss [6]. Basierend auf dieser Annahme wurden zahlreiche Experimente durchgeführt um die Existenz dieser Intermediate zu beweisen. Solche Strukturen, die teilweise gefaltet und teilweise aufgelöst sind, stellen einen thermodynamisch instabilen Zustand dar und existieren nur vorübergehend. Erst Fortschritte in der Entwicklung experimenteller Techniken wie Kernresonanzspektroskopie (NMR), Massenspektroskopie, H/D-Austausch, Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) haben es ermöglicht detaillierte Informationen über die verschiedenen Konformationen die während des Proteinfaltungsprozesses gebildet werden, zu erhalten [8]. Mithilfe von Computer-

simulationen konnten die experimentell gewonnenen Daten besser interpretiert werden. Zusätzlich wurden diese Versuche unter Bedingungen durchgeführt, bei denen die Intermediate stabilisiert und somit im Detail untersucht werden konnten.

Anhand der gewonnenen Daten wurden einige Modelle aufgestellt welche die Proteinfaltung beschreiben. Das Framework Modell geht davon aus, dass die Faltung hierarchisch erfolgt. Zuerst bilden sich lokale Sekundärstrukturelemente aus, die dann miteinander wechselwirken und sich anpassen, bis die endgültige Tertiärstruktur eingenommen ist [9]. Nach einem alternativen Modell, wird die Faltung durch einen spontanen Kollaps des Polypeptids in einen kompakten Zustand eingeleitet, der durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Resten vermittelt wird. Der Zustand, der aus diesem „hydrophoben Kollaps“ entsteht, kann einen hohen Gehalt an Sekundärstrukturen besitzen, aber viele Aminosäureseitenketten sind noch nicht endgültig fixiert. Diese Zwischenstufe wird häufig als „geschmolzene Kügelchen“ (molten globule) bezeichnet [10].

Die meisten Proteine falten sich wahrscheinlich in einem Prozess, der Merkmale beider Modelle aufweist [11]. Anstatt einem einzigen Weg zu folgen, kann eine Population von Peptidmolekülen auf verschiedene Wegen zum selben Endpunkt gelangen, wobei die Zahl partiell gefalteter Formen mit unterschiedlicher Konformation abnimmt, während die Faltung ihrem Abschluss zustrebt. Ob sich Sekundärstrukturelemente bereits vor dem hydrophoben Kollaps bilden, Domänen parallel oder nacheinander und welche spezielle Wechselwirkungen für die Bildung der nativen Struktur verantwortlich sind ist für jedes Protein unterschiedlich.

Die treibende Kraft bei diesem Vorgang ist die Abnahme der Freien Enthalpie, die beim Übergang von der zufälligen Knäuelkonformation (random-coil), die die höchste Energie und konformationelle Freiheit besitzt, in die stabile native Konformation auftritt. Die hydrophoben Aminosäuren werden zu einem sogenannten „core“ im Inneren des Proteins zusammengelagert, was die unpolare, hydrophobe Oberfläche auf ein Minimum bringt. Durch intramolekulare Wechselwirkungen wird die Struktur stabilisiert und somit die energetisch günstigste Konformation erreicht.

Den Proteinfaltungsprozess kann man sich am besten mithilfe des Faltungstrichters vorstellen, der die Energielandschaft während der Proteinfaltung repräsentiert (Abbildung 1.5). Die Höhe des Faltungstrichters spiegelt dabei die Energie des sich faltenden Proteins wieder, während seine laterale Ausdehnung auf einem Energieniveau die Entropie des Systems darstellt [12]. Die ungefalteten Zustände sind durch ein hohes Maß an konformationeller Entropie und eine hohe Freie Enthalpie gekennzeichnet. Die ungefaltete Polypeptidkette kann auf zahlreichen Wegen diverse Zwischenzustände einnehmen, die mehr oder weniger stabil sein können. Kleine Vertiefungen am Rand des Faltungstrichters repräsentieren semistabile Zwischenprodukte, die den Faltungsprozess etwas abbremsen können. Je mehr sich die Polypeptidkette ihrem nativ gefalteten Zustand annähert, desto geringer ist die Anzahl der möglichen Konformationen, und desto geringer ist damit auch die

Entropie des Systems. Dies wird durch die Verengung des Trichters dargestellt. Am tiefsten Punkt des Trichters hat sich aus einer Gruppe von Faltungsintermediaten eine einzige native Konformation gebildet.

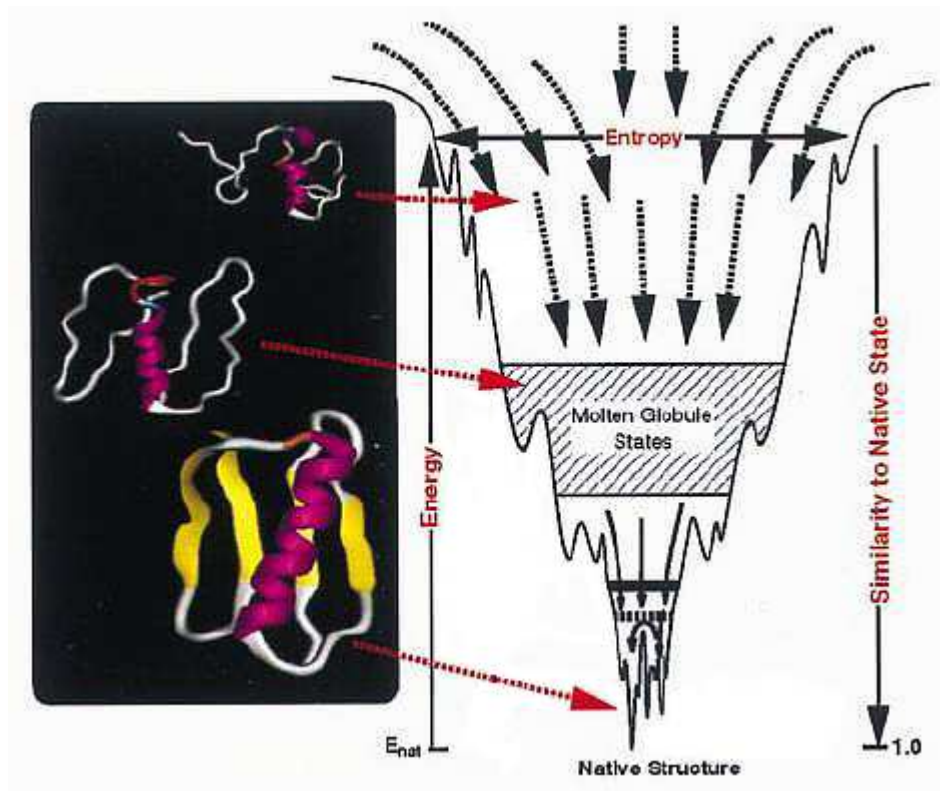


Abbildung 1.5: Die Thermodynamik der Proteinfaltung als Freier-Enthalpie-Trichter.

Am oberen Ende ist die Zahl der Konformationen, und deshalb auch die konformationelle Entropie, hoch. Nur ein kleiner Bruchteil der intramolekularen Wechselwirkungen, die in der nativen Konformation auftreten, ist bereits vorhanden. Während die Faltung fortschreitet, verringert der in den Trichter führende thermodynamische Weg die Zahl der vorliegenden Zustände (die Entropie nimmt ab), erhöht die Menge des Proteins in nativer Konformation und minimiert die Freie Enthalpie. Einbuchtungen am Rand des Trichters repräsentieren semistabile Zwischenprodukte der Faltung, die gelegentlich den Faltungsprozess verlangsamen können. Quelle [13].

Der native Zustand von Proteinen lässt sich sehr gut definieren. Die Struktur kann durch hochauflösende Methoden wie der Röntgenkristallographie oder der NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Der entfaltete Zustand hingegen besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Konformationen. Erzeugt werden diese durch Rotationen um die ϕ - und ψ -Winkel des Peptidrückgrats. In den letzten Jahren beschäftigten sich zahlreiche Arbeiten mit der Charakterisierung entfalteter Proteine. Nach neusten Studien unter Anwendung der NMR-Spektroskopie ist bekannt, dass unter stark denaturierenden Bedingungen nicht alle Aminosäureseitenketten einer Polypeptidkette frei beweglich sind, sondern immer noch Cluster von aliphatischen und aromatischen Resten existieren können [14, 15]. Unter mild denaturierenden Bedingungen die durch eine Änderung des pH-Wertes erzeugt werden, konnte die Existenz von nativ-ähnlichen Interaktionen gezeigt werden [16, 17]. Diese

Reststrukturen im ungefalteten Zustand schränken nicht nur die Suche nach der richtigen Konformation ein, sondern können auch die Proteinaggregation in Gang setzen [18, 19]. Faltungsintermediate die hydrophobe Bereiche exponieren, welche bei nativ gefalteten Proteinen im Inneren verborgen sind, können mit sich selbst assoziieren und zu Aggregate polymerisieren. Diese spezifischen intermolekularen Kontakte stellen eine Konkurrenzreaktion zu den intramolekularen Wechselwirkungen, die zur nativen Faltung führen, dar. Je höher die Stabilität dieser Faltungsintermediate, desto wahrscheinlicher tritt der Aggregationsprozess ein. Dies kann durch Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, Wechselwirkungen mit anderen Molekülen und durch Mutationen in der Aminosäuresequenz beeinflusst werden. Stabile Zwischenstufen, die nicht mehr die native Konformation einnehmen können, werden als fehl- oder mißgefaltete Proteine bezeichnet.

Die schematische Darstellung des Faltungstrichters in Abbildung 1.6 zeigt die unterschiedlichen Strukturen die während der Faltung und Aggregation eingenommen werden können. Aufgrund ihrer Starrheit stellen die Amyloidfibrillen die thermodynamisch stabilste Form dar [20]. Ihr Energieminimum ist tiefer als die der nativen Struktur, welche kleine konformationelle Änderungen zeigt, die durch Anbindung von Liganden, Anlagerung an Rezeptoren oder Interaktionen zwischen Protein-Untereinheiten hervorgerufen werden können.

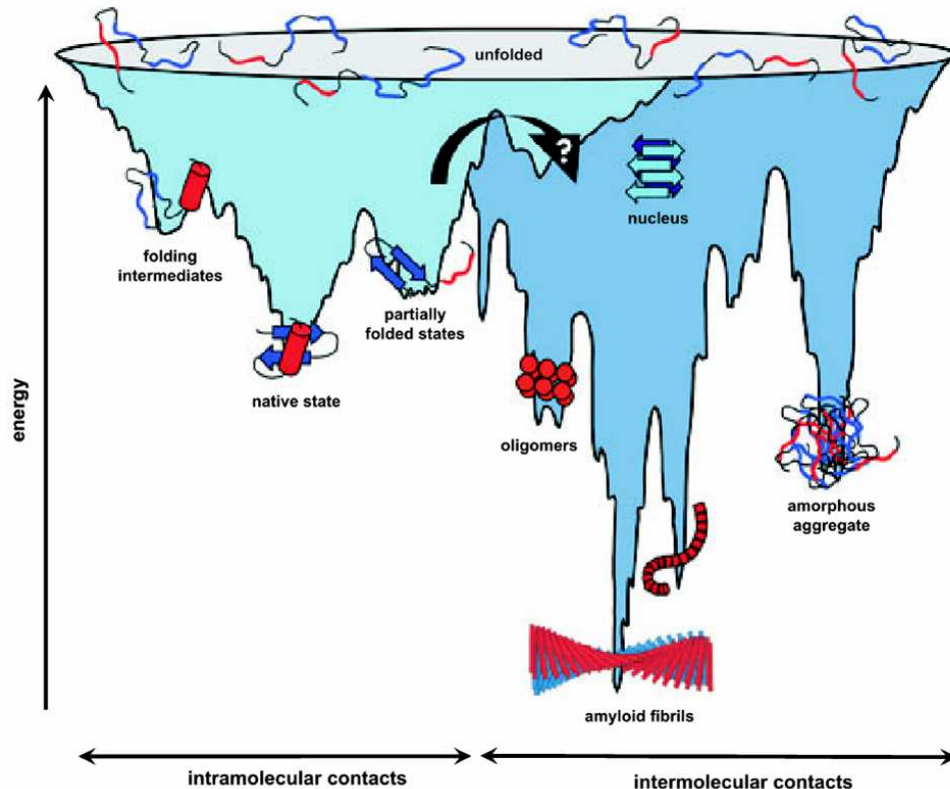


Abbildung 1.6: Energielandschaft für die Faltung und Aggregation eines Proteins basierend auf dem Modell des Faltungstrichters. Die Faltung eines Proteins ist auf verschiedenen Wegen möglich. Die Ausbildung der energetisch stabilen nativen Konformation erfolgt über intramolekulare Wechselwirkungen und die

Entstehung metastabiler Zwischenstufen. Unter meist noch unbekannten Bedingungen können sich durch intermolekulare Kontakte energetisch stabilere Strukturen bilden, zu denen auch die Amyloidfibrillen gehören. Quelle [20].

Um diesem Prozess der Fehlfaltung und Aggregation entgegenzuwirken hat sich im Laufe der Evolution eine komplexe Proteinfaltungsmaschinerie entwickelt. Dazu gehören eine Vielzahl von Helferproteinen, Chaperone genannt, die die vorzeitige Faltung neu synthetisierter Polypeptide verhindern [21-23]. Sie erkennen und binden die exponierten hydrophoben Seitenketten an ungefaltete Proteine und schützen somit vor Fehlfaltungen. Zusätzlich können Chaperone missgefaltete Proteine binden. Sie fördern ihre Rückfaltung und helfen der Polypeptidkette die korrekte Konformation einzunehmen. Proteine mit Fehlfaltungen, die nicht mehr reversibel sind, werden über das Ubiquitin-Proteasom-System in der Zelle abgebaut [24].

An der Faltung von Polypeptidketten sind noch weitere Proteine beteiligt. Dazu gehören die Isomerasen, wie z.B. die Protein-Disulfid-Isomerase, welche die Oxidation, Reduktion und Umlagerung von Disulfid-Brücken katalysiert und die Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, welche die cis-/trans-Umwandlung von Prolin-Imid-Peptidbindungen beschleunigt [25].

Proteine die ihren nativen Zustand bereits erreicht haben, können sich aufgrund von Änderungen des Umgebungsmilieus und Kontakte mit anderen Proteinen oder identischen Polypeptidketten, teilweise entfalten, was auch zu einer Fehlfaltung und Aggregation führen kann. Fehlgfaltete Proteine werden in den Aggregaten von der zellulären Qualitätskontrolle nicht mehr erfasst. Sie können somit nicht mehr für den Abbau markiert und durch das Proteasom abgebaut werden. Hierfür ist ein anderer Mechanismus verantwortlich. Das Autophagen-System hat nicht nur die Funktion überschüssige Organellen in den Zellen abzubauen, sondern kann auch Proteinaggregate erkennen, die zunächst durch die Ausbildung eines Vesikels eingefangen und für den Abbau zu den Lysosomen transportiert werden [24]. Eine hohe Aktivität dieses Prozesses wurde bei den Erkrankungen Huntington, Parkinson und Alzheimer beobachtet, was zu der Annahme führt, dass dies ein Mechanismus für den Abbau von toxischen intrazellulären Aggregaten sein könnte [24].

1.2 Aggregation von Proteinen zu Amyloidfibrillen

Heutzutage sind über 30 Krankheiten bekannt, die mit der Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen zusammenhängen [26]. Dazu gehören Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington, Parkinson, die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (auch Prion-Erkrankungen genannt) und der Typ II Diabetes. Hier sind die Ablagerungen nur auf einzelne Organe lokalisiert. Bei den systemischen Erkrankungen, wie beispielsweise die amyotrophe Lateralsklerose, können die Ablagerungen verschiedene Organe und Gewebe betreffen [26]. Sie können in sporadischen Formen auftreten, die mit zunehmenden Alten immer wahrscheinlicher werden, oder sind auf genetische (familiäre) Faktoren zurückzuführen.

Diese vererbbaeren Defekte, die aufgrund von Mutationen entstanden sind, führen im Vergleich zu den sporadischen Formen zu einem früheren Ausbruch der Krankheit.

Obwohl diese Erkrankungen durch verschiedene Proteine ausgelöst werden, bilden all diese Proteine Aggregate die einige charakteristische Gemeinsamkeiten aufweisen. Sie bestehen aus unlöslichen hoch-geordneten Strukturen, den so genannten Amyloidfibrillen, die einen hohen Anteil an β -Faltblatt in der Sekundärstruktur aufweisen. Die Amyloidablagerungen bestehen aus Tausenden solcher Amyloidfibrillen die ungeordnet zueinander liegen (Abbildung 1.7 Mitte). In Tabelle 1.1 sind einige dieser amyloidogenen Proteine und die mit ihnen assoziierten Krankheiten, die auch als Amyloidosen bezeichnet werden, aufgelistet. Die Amyloidablagerungen bestehen meistens aus Fibrillen die mit Plasmaproteinen und Proteoglycanen assoziiert sind. In Abbildung 1.7 sind mikroskopische Aufnahmen einiger dieser Amyloid-Plaques zu sehen.

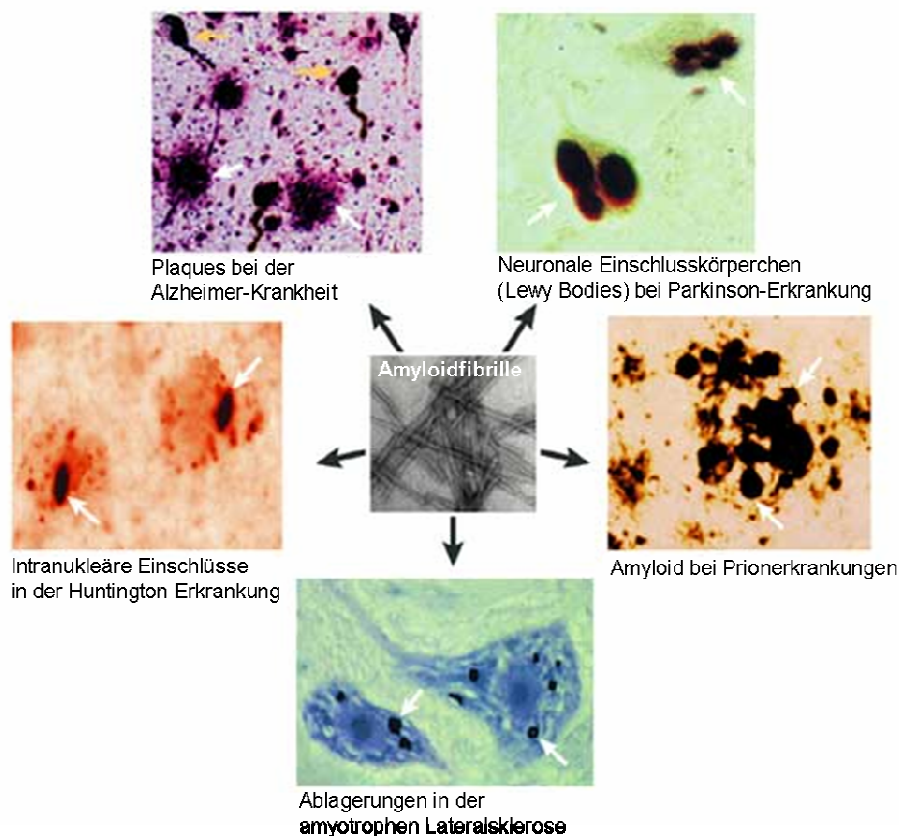


Abbildung 1.7: Ablagerungen einiger Amyloidosen. Bei der Alzheimer-Krankheit werden außerhalb der Zelle (weiße Pfeile) und auch intrazellulär (gelbe Pfeile) Aggregate gebildet. Cytoplasmatische Ablagerungen sind typisch bei Parkinson und der amyotrophen Lateralsklerose. Bei den Prionerkrankungen werden extrazelluläre Amyloide gebildet, wohingegen bei der Huntington-Erkrankung die Ablagerungen im Zellkern entstehen. Ausgehend von verschiedenen Proteinen entstehen im Verlauf dieser Erkrankungen Aggregate die eine ähnliche Konformation und Morphologie (Mitte) zeigen. Quelle [28].

Tabelle 1.1: Amyloidogene Proteine und mit ihnen assoziierte Erkrankungen. Quelle [27-29].

Erkrankung	Amyloidbildendes Protein	Betroffene Regionen
Alzheimer Erkrankung	Amyloid- β -Protein (A β)	Gehirn
Amyotrophe Lateralsklerose	Superoxid-Dismutase 1	systemisch
Chorea Huntington	Huntingtin	Gehirn
Insulin Amyloidose	Insulin	subkutan
Lysozym Amyloidose	Lysozym	systemisch
Parkinson Erkrankung	Synuclein	Gehirn
Prion-Erkrankungen	Prion-Protein	Gehirn
Typ II Diabetes	Inselamyloid Polypeptid	Pankreas

1.2.1 Mechanismen der amyloiden Fibrillenbildung

Anhand von *in vitro* Studien wurde der Verlauf der Aggregation, die den Übergang vom löslichen Zustand des Proteins zu unlöslichen fibrillären Strukturen beinhaltet, untersucht. Es wurde gezeigt, dass sowohl kleine, nativ-ungefaltete Peptide als auch Proteine mit nativer Konformation unter bestimmten Bedingungen zur Fibrillenbildung neigen. Diese Prozesse beinhalten konformationelle Umstrukturierungen wie partielle Entfaltungen und Übergänge von α -helikalen Strukturen zu β -Faltblättern [26].

Um die Aggregation *in vitro* initiieren zu können muß zunächst bei nativ-gefalteten Proteinen die Struktur destabilisiert werden, was z.B. durch niedrige pH-Werte oder hohe Temperaturen erreicht wird [24]. Unter solchen Bedingungen erhöht sich die Population partiell entfalteter Konformationen. Diese Strukturen exponieren nach außen hin hydrophobe Regionen der Polypeptidkette, wodurch die Wahrscheinlichkeit für intermolekulare Interaktionen erhöht wird. Welche Faktoren genau die Destabilisierung der nativen Struktur *in vivo* hervorrufen ist nur von wenigen Proteinen bekannt.

Es wird angenommen, dass partiell entfaltete Intermediate bei vielen amyloidogenen Proteinen eine Hauptrolle spielen [24]. Bei einigen Proteinen wurde als Ausgangsstruktur für die Proteinaggregation die entfaltete oder die native Konformation beschrieben. Die Frage, wie die Monomere sich im Detail zur Ausbildung amyloider Strukturen anlagern, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurden einige Modelle vorgeschlagen die diesen Prozess beschreiben (Abbildung 1.8). Wie bereits erwähnt beinhaltet die Fibrillenbildung, ausgehend von nativen Konformationen, das Exponieren von Bereichen die sich eigentlich im Inneren der Struktur befinden und unzugänglich sind. An diesen Regionen können die Monomere binden und polymerisieren.

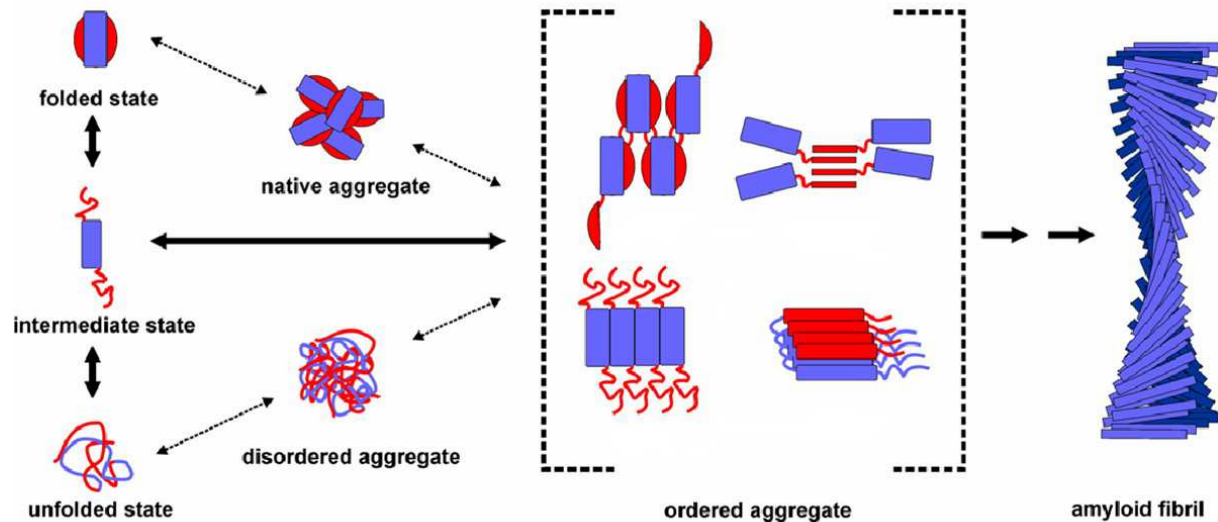


Abbildung 1.8: Mechanismen der Proteinaggregation. Die Fibrillenbildung vieler amyloidogener Proteine wird über partiell gefalteter Intermediate ausgelöst, die durch die Entfaltung der nativen Struktur oder durch Reststrukturen entfalteter Proteine gebildet werden. Die Assoziation zu geordneten Aggregaten kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Die Selbstassoziation dieser frühen oligomeren Spezies führen über weitere konformationelle Änderungen – Ausbildung von geordneten β -Faltblatt-Strukturen – zu der Entstehung von Amyloidfibrillen. Quelle [24].

Trotzt der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen aggregieren amyloidogene Peptide und Proteine zu fibrillären Strukturen mit ähnlichem Aufbau. Das Vorhandensein gemeinsamer Strukturmerkmale wurde nicht nur durch Röntgenstrukturanalysen gezeigt [30, 31], sondern durch einige Antikörper bestätigt, die die amyloiden oder amyloid-ähnlichen Strukturen unterschiedlicher Proteine erkannten, nicht aber deren lösliche monomere Formen [32].

1.2.2 Die Charakterisierung und Ausbildung amyloider Fibrillen

Bereits vor 49 Jahren wurde die räumliche Anordnung amyloider Fibrillen als eine „Cross- β “-Struktur definiert. Die Eigenschaft, dass Fibrillen unlöslich und nicht kristallisierbar sind, erschwerte dennoch die Untersuchungen ihrer Struktur. Durch Fortschritte in der Entwicklung neuer experimenteller Methoden ist es gelungen den Aufbau der Fibrillen im Detail zu beschreiben. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen [33-35] und rasterkraftmikroskopischen (AFM-)Analysen [36] konnte die Morphologie der Aggregate beschrieben werden. Sie haben eine fibrilläre Struktur die gerade und unverzweigt ist, können 0,1 - 10 μm lang sein, haben einen Durchmesser von 70 - 120 $\text{\AA}$ [24] und sind aus mehreren Protofilamente ($\varnothing$ 25-30 $\text{\AA}$, Abbildung 1.9 A Mitte) aufgebaut, die parallel angeordnet sind. Die genaue Anordnung und Anzahl der Protofilamente variiert jedoch je nach Amyloid [37, 38]. In Abbildung 1.9 A ist eine schematische Darstellung des Aufbaus von amyloiden Fibrillen zu sehen.

Detaillierte Informationen über den Fibrillenaufbau wurden durch Röntgenstrukturanalysen erreicht. Es wurde ein Beugungsmuster mit einer intensiven 4,7 $\text{\AA}$ -meridionalen Reflexion

und einer diffuseren 10,0 Å-äquatorialen Reflexion gemessen (Abbildung 1.9 B), welches charakteristisch für die so genannte Kreuz- β -Struktur [39, 30, 31] ist, bei der die β -Stränge senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind. Dabei entspricht die 4,7 Å-meridionale Reflexion den Abständen der β -Stränge, die 10,0 Å-äquatoriale Reflexion entspricht dem Abstand zwischen den verschiedenen β -Faltblättern. Stabilisiert wird diese Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Amidgruppen der Polypeptidketten parallel zur Fibrillenachse. Weitere Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass die β -Stränge kein flaches β -Faltblatt bilden, sondern um 15° gegeneinander verdreht sind; ein Faltblatt aus sechs Strängen würde also eine 90°-Umdrehung durchlaufen. Anhand dieser Daten wurde ein verfeinertes Modell vorgeschlagen, welches beschreibt, dass die β -Faltblätter eine Helix entlang der Fibrillenachse bilden, wobei 24 β -Stränge eine Umwindung darstellen (Abbildung 1.9 C) [31].

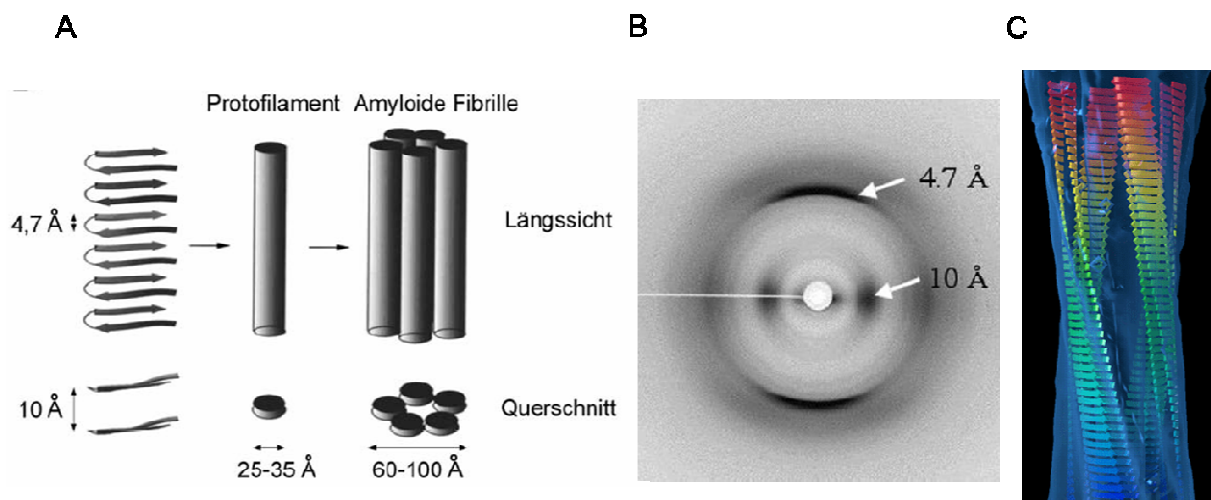


Abbildung 1.9: Struktur amyloider Fibrillen. (A) Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines Protofilaments und die Anlagerung zur amyloiden Fibrille. Quelle [37]. (B) Röntgenbeugungsmuster einer A β (1-42) amyloiden Fibrille. Quelle [30]. (C) Molekulares Modell einer amyloiden Fibrille, bestehend aus vier Protofilamenten die um die Fibrillenachse verdreht sind. Quelle [40].

Obwohl nur einige der amyloidogenen Proteine Ähnlichkeiten in ihren Primärsequenzen aufweisen, bilden sie alle Aggregate mit sehr ähnlichen Strukturen und charakteristischen Gemeinsamkeiten. Sie lassen sich mit dem Diazofarbstoff Kongorot färben und zeigen dabei eine typische grüne Doppelbrechung und Rotverschiebung des Absorptionsspektrums [41, 42]. Die Farbstoffe Thioflavin S und Thioflavin T können mit den fibrillären Strukturen wechselwirken, was zu einer Verschiebung ihrer Fluoreszenzspektren führt [43] (Abbildung 1.10). Amyloide Aggregate sind unlöslich und resistent gegen proteolytische Degradation.

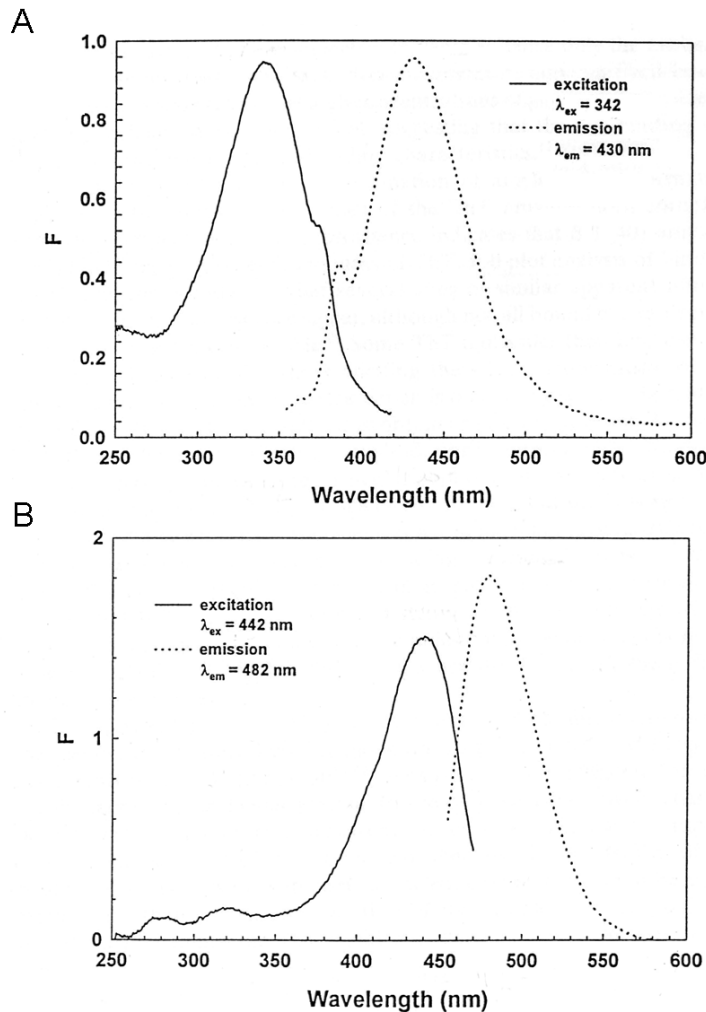


Abbildung 1.10: Fluoreszenzspektren von freiem und an A β (1-42) gebundenem Thioflavin T. (A) Thioflavin T wird bei einer Wellenlänge von 342 nm angeregt. Die Fluoreszenzemission wird bei 430 nm gemessen. (B) Bei Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes an amyloiden Fibrillen wird dessen Emission- und Extinktionswellenlänge verschoben. Der Amyloid-Thioflavin T-Komplex wird bei 442 nm angeregt, die Fluoreszenzemission wird bei 482 nm detektiert. Freies Thioflavin T wird in der Mischung durch die Änderung der Anregungswellenlänge nicht gemessen. Quelle [44].

Die Fibrillogenese von amyloidogenen Proteinen wird als ein nukleationsabhängiger Prozess beschrieben [24]. Dieser Mechanismus ist charakterisiert durch eine langsame Nukleationsphase, in der in energetisch ungünstigen Schritten der Nukleus gebildet wird (Abbildung 1.11 A). Die Zeit, die für die Ausbildung des Nukleus erforderlich ist, wird graphisch als lag (Verzögerungs)-Phase dargestellt (Abbildung 1.11 C). In der Nukleationsphase wurden anhand von massenspektroskopischen Analysen oligomere Spezies detektiert. Danach folgt eine schnelle Wachstumsphase, bei der die Anlagerung von Monomeren oder oligomeren Strukturen an den Nukleus zur Ausbildung der Fibrillen stattfindet [45-48]. Die lag-Phase kann durch die Zugabe vorgeformter Oligomere und Protofilamente als Polymerisationskeime verkürzt oder ganz übersprungen werden. Die Bildung der Fibrillen kann mikroskopisch mittels TEM oder AFM nachgewiesen werden. Der Verlauf der Fibrillogenese lässt sich durch die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T detektieren (Abbildung 1.11 B und C).

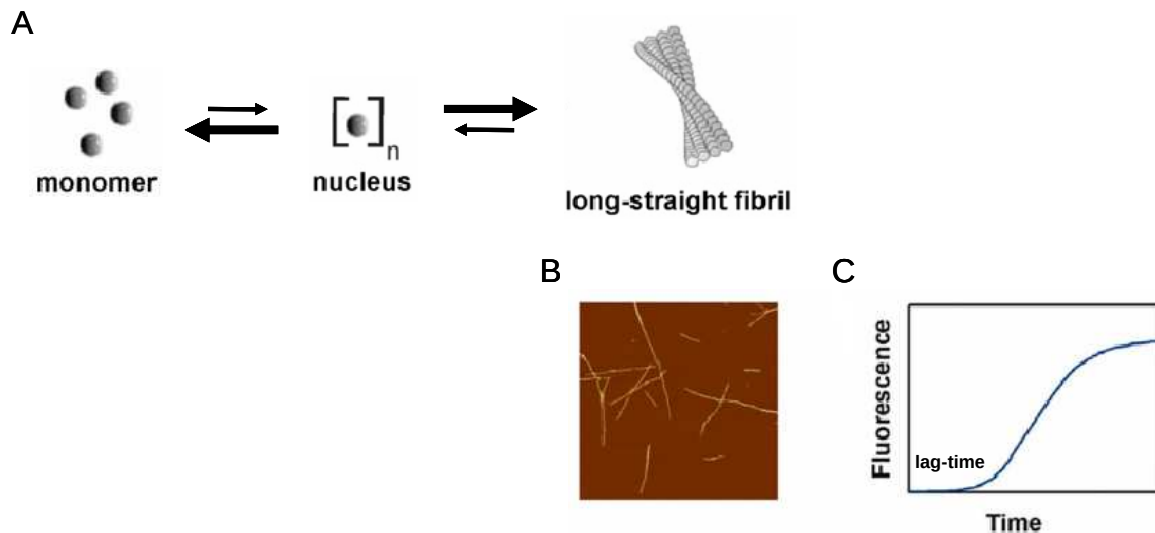


Abbildung 1.11: Aggregationsverlauf amyloider Fibrillen. (A) Darstellung des nukleationsabhängigen Prozesses. (B) AFM-Aufnahmen zur Detektion der fibrillären Strukturen. (C) Graphische Darstellung des Verlaufs der Fibrillogenese durch Thioflavin T-Anbindung. Der nukleationsabhängige Prozess ist durch eine lag-Phase charakterisiert. Quelle [24].

1.2.3 Bedeutung der oligomeren Strukturen und Protofilamente

Mithilfe der Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie wurden als Intermediate oligomere Strukturen und Protofilamente entdeckt und charakterisiert, die während der Fibrillogenese gebildet werden [24]. Ob alle Zwischenstufen zum Prozess der Fibrillenbildung gehören (on-pathway) oder ihre Bildung außerhalb dieses Prozesses ist (off-pathway), und welche der Strukturen die zelltoxische Form darstellt, gehören auf diesem Gebiet zu den am meist diskutierten Fragen. Studien der letzten Jahre deuten darauf hin, dass ausgereifte Fibrillen biologisch relativ inert sind, und dass generell die prä-fibrillären Strukturen die toxischen Spezies darstellen [24]. Anhand von zwei Proteinen (HypF, SH3), die nicht mit amyloidogenen Krankheiten assoziiert sind, wurde gezeigt, dass frühe Aggregate (Protofilamente) zytotoxisch waren, während die Fibrillen, die aus diesen Strukturen aufgebaut wurden, keine Toxizität mehr aufwiesen [49]. Es wurden aber auch Beispiele geschildert, bei denen ausgereifte Fibrillen in Zusammenhang mit der Zelltoxizität stehen [50]. Diese Daten unterstützten die Ansicht, dass der Einschluss toxischer Spezies in fibrilläre Strukturen ein Schutzmechanismus sein könnte.

Im Gegensatz zu den Fibrillen ist aufgrund ihrer Metastabilität und unterschiedlicher Morphologie wenig über die Struktur und den molekularen Aufbau der Oligomere und Protofilamente bekannt. Ergebnisse neuester Studien deuten darauf hin, dass Protofilamente im Vergleich zu den Fibrillen eine weniger geordnete Struktur aufweisen und einen geringeren Anteil an β -Strängen haben [24]. Fink und seinen Mitarbeitern gelang es die kurzlebigen Oligomere, die während der Selbstassoziation des nativ-entfalteten Proteins α -Synuclein gebildet werden, zu charakterisieren [51, 52]. Die frühen Oligomere zeigten einen signifikanten Anteil an β -Faltblättern und exponierten hydrophobe Bereiche. Ihre

Struktur wurde als kompakt und partiell gefaltet beschrieben. Eine weitere Studie deutete darauf hin, dass lösliche Oligomere verschiedener amyloider Proteine gemeinsame Konformationseigenschaften besitzen [53]. Bei dieser Versuchsreihe wurde festgestellt, dass ein Antikörper (A11), der gegen lösliche Oligomere des Amyloid- β -Proteins ($A\beta$) entwickelt wurde, auch an lösliche Oligomere anderer amyloider Peptide wie α -Synuclein, Inselamyloid Polypeptid, Polyglutamin, Lysozym, humanes Insulin, Prionpeptid 106-146 binden, nicht aber deren Monomere oder reife Fibrillen detektieren konnte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass dieser Antikörper die *in vitro*-Toxizität löslicher Oligomere inhibieren kann. Außerdem konnte mit Hilfe des A11-Antikörpers gezeigt werden, dass Oligomere im Alzheimer-Gehirn getrennt von Fibrillen vorkommen und somit eine gesonderte toxische Form darstellen [53]. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass Oligomere, die aus unterschiedlichen amyloidogenen Peptiden und Proteinen gebildet werden, ähnliche Strukturmerkmale aufweisen. Es wird daher angenommen, dass es auch Gemeinsamkeiten bei der Ausbildung dieser Oligomere sowie ihrer toxischen Wirkung geben könnte.

1.2.4 Entdeckung von Kernsequenzen

Die enorme Diversität von Proteinen, die mit amyloiden Fibrillen in Verbindung gebracht werden ist in Abbildung 1.12 dargestellt. Dies können monomere Proteine, kleine Peptide oder Multimere sein. Die unter physiologischen Bedingungen gebildeten Strukturen reichen von nativ-ungefalteten oder helikalen Konformationszuständen bis hin zu Polypeptiden und Proteinen, die teilweise oder ausschließlich aus β -Faltblattbereichen aufgebaut sind. Es wurde gezeigt, dass während des Aggregationsprozesses globulärer Proteine der native Zustand zunächst in dem Maße partiell entfalten wird, dass Vorstufen gebildet werden, die zur Aggregation neigende Regionen exponieren, welche im nativ gefalteten Zustand gegen intermolekulare Wechselwirkungen geschützt sind [24]. Da die strukturelle Charakterisierung amyloidogener Vorstufen durch ihre konformationelle Flexibilität, Seltenheit und Heterogenität erschwert wird, wurde unter Durchführung theoretischer Studien versucht, die frühen molekularen Ereignisse während der Selbstassoziation zu beschreiben [24]. Anhand von Computersimulationen dieser Prozesse wurde gezeigt, dass die Polypeptidkette durch einen hydrophoben Kollaps teilweise geordnete oder amorphe Aggregate ausbildet, die sich danach durch die Optimierung der intermolekularen Wechselwirkungen zu geordneten β -Faltblatt Aggregaten umstrukturierten [24]. Obwohl ein großer Teil der Polypeptidkette an der Ausbildung von fibrillären Strukturen beteiligt sein kann, haben nur einige darin enthaltene Aminosäuresequenzen eine hohe Aggregationsneigung. Es wurden experimentelle Beweise geliefert, dass diese kleinen Abschnitte die Aggregation großer, löslicher Proteine auslösen können [24]. Die intermolekulare Wechselwirkung zur Ausbildung der Fibrillen erfolgt an diesen so genannten Kernsequenzen. Durch die Kombination von Versuchsdaten und Computersimulationen konnten Voraussagungen über die Tendenz zur Aggregation getroffen werden, die besagen, welche Aminosäuresequenzen wie stark zur

Ausbildung von β -Faltblatt-Aggregaten neigen. In Abbildung 1.12 sind die nativen Strukturen von Peptiden und Proteinen dargestellt, die aufgrund ihrer Aggregationstendenz mit humanen Krankheiten assoziiert werden. Die Kernsequenzen sind je nach ihrer Aggregationsneigung in farbigen Abstufungen von gelb bis rot (stärkste Neigung) dargestellt. In den nativ gefalteten Konformationen sind diese Sequenzen in unterschiedlichen Bereichen zu finden. Sie sind in der Ausbildung von α -Helices und β -Faltblättern integriert, können aber auch ungefaltete Bereiche darstellen. Die Entdeckung dieser Kernsequenzen ermöglichte die Entwicklung therapeutischer Moleküle, welche die Selbstassoziation amyloider Peptide und Proteine zu toxischen Aggregate unterbinden können.

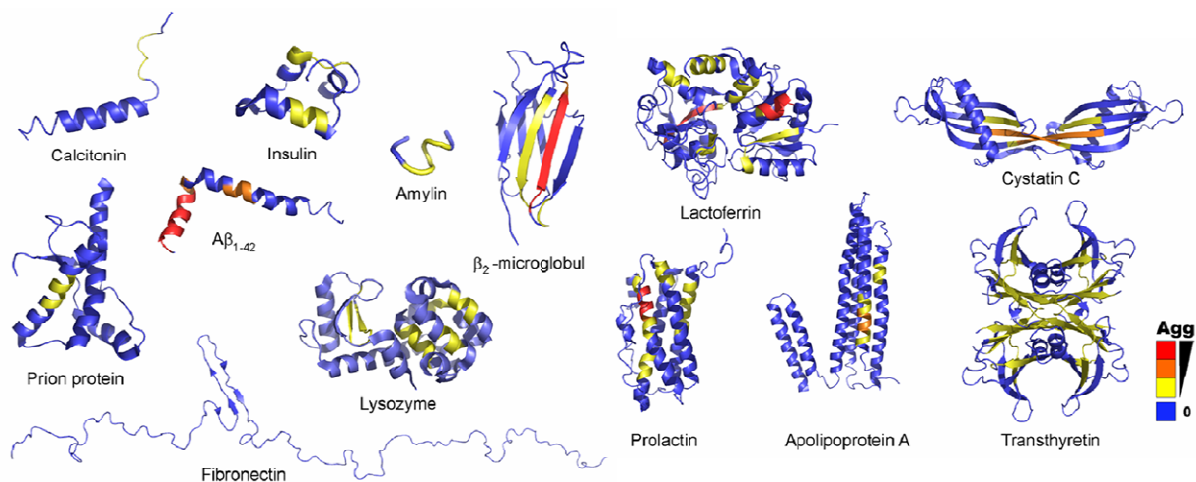


Abbildung 1.12: Native Strukturen amyloider Peptide und Proteine. Die für die Aggregation verantwortlichen Regionen wurden durch den Algorithmus TANGO hervorgesagt. Die Kernsequenzen sind je nach ihrer Aggregationsneigung gelb, orange oder rot (stärkste Neigung) gefärbt. Die blauen Abschnitte zeigen keine Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblatt-Aggregaten. Quelle [24].

1.3 Typ II Diabetes

Der Diabetes Mellitus ist eine chronische Störung der Verwertung von Glucose im Stoffwechsel, welche auf einen Insulinmangel oder eine Insulinresistenz zurückzuführen ist. Die dadurch ausgelösten Veränderungen im Kohlenhydrat-, Eiweiß-, und Fettstoffwechsel führen unter anderem zu einer Leistungsminderung und Gewichtsabnahme. Langfristig kommt es vor allem zu Veränderungen der Blutgefäße und dadurch bedingten Schäden an Organen und Geweben. Der insulinabhängige Diabetes (Typ I Diabetes) ist auf eine Autoimmunreaktion gegen die Insulin-produzierenden Zellen im Pankreas zurückzuführen. Der Körper kann kein eigenes Insulin mehr produzieren. Diese Form kann bereits im Kindesalter vorkommen. Der nicht-insulinabhängige Diabetes (Typ II), früher auch „Altersdiabetes“ genannt, ist durch eine Insulinresistenz verschiedener Gewebe (Muskel, Leber) und eine verminderte Insulinbildung charakterisiert [54]. Heutzutage erkranken immer mehr junge Menschen an dieser Form der Zuckerkrankheit. 90 % aller Diabetiker leiden an Typ II Diabetes [55]. Mittlerweile ist bekannt, dass eine der Ursachen für die verminderte Insulinproduktion bei Typ II Diabetes die Zerstörung der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse ist, welche mit der Fehlfaltung und Amyloidbildung eines Peptidhormons namens Inselamyloid Polypeptid zusammenhängt.

1.3.1 Physiologische Funktion und Aggregation von Inselamyloid Polypeptid

Inselamyloid Polypeptid (IAPP), auch Amylin genannt, ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid, das zusammen mit Insulin in den β -Zellen des Pankreas synthetisiert, in Vesikeln gespeichert und als Antwort auf hohe Blutzuckerwerte co-sekretiert wird. Das molare Verhältnis zwischen IAPP und Insulin beträgt 1:100 [56]. IAPP wird in Form eines aus 89 Aminosäuren bestehenden Prä-pro-IAPP exprimiert [57]. Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz wird das Pro-IAPP (67 Aminosäuren) gebildet, welches in den sekretorischen Vesikeln gespeichert wird [58]. Hier werden vor der Sekretion des IAPPs, ähnlich wie bei der Prozessierung von Pro-Insulin, die N- und C-terminalen Pro-Sequenzen abgespalten [59]. Es wird angenommen, dass die Lagerung von IAPP in Form eines Vorläuferproteins einen Schutzmechanismus darstellt, der die IAPP-Aggregation verhindern soll, die durch die hohe Konzentration des Peptids in den Vesikeln ausgelöst werden kann [60]. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass nach Abspaltung der Pro-Sequenzen die Fehlfaltung und Selbstassoziation von IAPP in den Vesikeln durch die Interaktion mit weiteren granulären Peptiden, wie Insulin, C-Peptid und Pankreastatin, unterbunden wird [61, 62].

Die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten auf Position 2 und 7 (Abbildung 1.13) sowie der amidierte C-Terminus sind für die biologische Funktion des IAPPs notwendig [63]. Zu seinen Aufgaben gehört die Ergänzung der Insulinwirkung bei der Regulation des

Kohlenhydrat- und Nährstoffwechsels: IAPP kontrolliert durch verschiedene Effekte die Nährstoffaufnahme in einen zentralen Nährstoffpool, während Insulin vor allem die Verwertung dieser Nährstoffe beeinflusst [64]. Ein wichtiger Teil dieser regulatorischen Funktion von IAPP ist seine hemmende Wirkung auf die Magenentleerung. Somit wird dieses Peptid zu den Sättigungshormonen gezählt [64].

Heutzutage ist bekannt, dass IAPP den Hauptbestandteil der Amyloidablagerungen in den Langerhansschen Inseln bildet, die typischerweise bei Typ II Diabetikern zu finden sind. Diese Ablagerungen in der Bauchspeicheldrüse wurde bereits im Jahre 1900 bei Diabetikern festgestellt [65]. Dennoch gelang erst im Jahre 1987 die Beschreibung dieser Ablagerungen durch die Isolierung und Charakterisierung dieses zuvor unbekannten Peptids [66, 67].

Obwohl 80 % der IAPP-Sequenz bei Säugetieren hoch-konserviert ist (Abbildung 1.13), wurden nur bei bestimmten Spezies, wie z.B Menschen, Affen, Katzen und Hunden, IAPP-Ablagerungen in Zusammenhang mit Altersdiabetes nachgewiesen [58]. Bei Mäusen und Ratten wurden keine Amyloidablagerungen im Pankreas festgestellt. Der Sequenzvergleich dieser Spezies führte zu der Hypothese, dass die Aminosäurezusammensetzung der hydrophoben Region 20-29 ausschlaggebend für die Aggregationsneigung von IAPP ist (Abbildung 1.13). Anhand von *in vitro* Studien wurde festgestellt, dass während der Aggregation in diesem Sequenzbereich die β -Stränge ausgebildet werden, an denen die IAPP-Moleküle zur Ausbildung von fibrillären Strukturen selbstassoziiieren [58]. Dieser Sequenzabschnitt wird aufgrund seiner Bedeutung als Kernsequenz bezeichnet (Kapitel 1.2.4). In Abbildung 1.13 ist zu sehen, dass die IAPP-Kernsequenzen von Mäusen und Ratten drei Proline enthalten. Da die Aminosäure Prolin, aufgrund ihrer geometrischen Anordnung (cis-Konfiguration), als beta-brechender Baustein gilt, d. h. sie verhindert die Ausbildung von β -Strängen [68, 69], sind die IAPP-Sequenzen der Nagetiere vor der Selbstassoziation zu fibrillären Aggregaten geschützt. Der Austausch von Aminosäuren in der Kernsequenz kann auch zu einem schnelleren Verlauf der Aggregation führen. Seino und seine Mitarbeiter beschrieben 2001 eine Mutation des hIAPPs die in Japan vorkommt und zu einem erhöhten Risiko führt an Typ II Diabetes zu erkranken [70]. Diese Veränderung der Sequenz beinhaltet nur einen Aminosäureaustausch an der Position 20 (S20G, Abbildung 1.13). Inzwischen wurden zahlreiche Studien durchgeführt um den molekularen Mechanismus der IAPP-Aggregation beschreiben zu können, seine zelltoxischen Spezies zu identifizieren und potentielle Therapiemöglichkeiten zu entwickeln [71, 74, 75, 77-79, 88, 90, 92-97].

Anhand von *in vitro* Studien mit synthetischem hIAPP und Tierexperimenten mit transgenen Mausmodellen, die humanes IAPP exprimieren, wurde darauf hingewiesen, dass die Ursache für den Verlust an β -Zellen eine erhöhte β -Zell-Apoptoserate sein könnte [72, 73], welche durch prä-fibrilläre Aggregate ausgelöst werden soll [74, 75]. Die Ergebnisse dieser Studien deuteten zusätzlich darauf hin, dass die hIAPP-Monomere und Fibrillen, sowie IAPP aus Ratten (rIAPP) keine toxische Wirkung auf die β -Zellen haben. Zusätzlich haben Daten

aus *in vitro* Experimente bestätigt, dass hIAPP nicht in der Lage ist fibrilläre Strukturen auszubilden [76, 77].

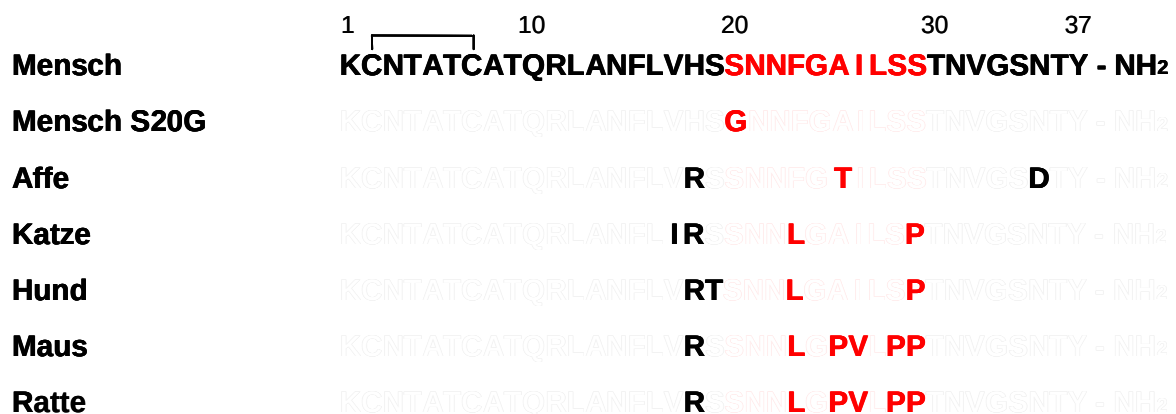


Abbildung 1.13: Vergleich der Aminosäuresequenz des hIAPPs mit IAPP-Sequenzen einiger Säugetiere. Die Kernsequenz IAPP(20-29) ist rot markiert. Die Mutation S20G des hIAPPs kommt in Japan vor und führt einem früheren Ausbruch des Typ II Diabetes. Die drei Proline in der IAPP-Sequenz der Nagetiere sind ausschlaggebend für die nicht-amyloidogene Eigenschaft des Peptids. Quelle [71].

Die Aggregation und Fibrillenbildung von hIAPP *in vitro* wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. In den meisten Studien wurde die Aggregation von IAPP initiiert, indem synthetisches, monomeres hIAPP in einem physiologischen Puffer verdünnt wurde [78]. Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, der spezifischen Anfärbung von Amyloidfibrillen (Kapitel 1.2.2, S. 15) und CD-spektroskopischen Messungen wurde gezeigt, dass die Aggregation zu Fibrillen ein nukleationsabhängiger Mechanismus (Kapitel 1.2.2, S. 15) ist, der von der Konzentration abhängt und bereits nach wenigen Stunden abgeschlossen ist [58, 79]. Während der Nukleationsphase wurden partiell entfaltete Intermediate nachgewiesen, die hydrophobe Bereiche exponierten [79].

Trotz intensiver Forschung ist die dreidimensionale Struktur der IAPP-Monomere und prä-fibrilläre Aggregate noch nicht aufgeklärt. Experimentelle Daten haben gezeigt, dass nicht aggregiertes IAPP eine random-coil (Zufallsknäuel-)Struktur aufweist, mit wenigen α -helikalen und β -Faltblatt Merkmalen [79, 80]. Es wurde nachgewiesen, dass die IAPP-Moleküle, bevor sie sich zu oligomeren und fibrillären Strukturen aneinander lagern, eine konformationelle Umwandlung von α -Helix zu β -Faltblatt durchführen [79]. Es wird angenommen, dass die gebildeten IAPP-Oligomere oder -Aggregate aus mindestens zwei und bis zu 6000 Molekülen bestehen können [81-84].

Untersuchungen bezüglich der strukturellen Eigenschaften haben gezeigt, dass die Kernsequenz hIAPP(20-29) fibrilläre Aggregate ähnlich der vollständigen Polypeptidkette ausbilden kann [77, 85]. Als kürzeste, fibrillenbildende Sequenz der genannten Kernregion, wurde in unserer Arbeitsgruppe das Fragment hIAPP(23-27) identifiziert [92]. Basierend auf diese Daten wurden die unter Kapitel 1.3.2 beschriebenen IAPP-Inhibitoren designt. Aus weiteren experimentellen Daten ist bekannt, dass die 20-29 Region nicht die einzige ist, die

für die Fibrillenbildung wichtig ist; das hIAPP-Fragment 14-20 kann ebenfalls Fibrillen ausbilden [86, 87].

Anhand weiterer Experimente wurde beobachtet, dass Phospholipid-Membranen mit negativ geladenen Lipiden die Aggregation von hIAPP katalysieren [78]. Durch Studien mit Modellmembranen wurde gezeigt, dass hIAPP-Moleküle durch positiv geladene Aminosäurereste an Phospholipide binden können, dabei zunächst eine α -helikale Konformation einnehmen, die nach wenigen Minuten zu β -Faltblättern umstrukturiert wird, was letztendlich zu der Fibrillenbildung führt [78, 88]. Durch die Anwendung von mikroskopischen Methoden wurde gezeigt, dass humanes IAPP Poren in Membranen ausbilden kann, die zu einem Zelltod der β -Zellen im Pankreas führen könnten [78]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt.

Vor kurzem zeigten zwei Arbeitsgruppen, dass toxische IAPP-Spezies nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär vorkommen, welche die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien zerstören und somit die Apoptose in β -Zellen auslösen [78]. Monomeres und fibrilläres hIAPP konnte dagegen die Membranen nicht destabilisieren. Toxische IAPP-Spezies können nicht nur durch Porenbildung die Membran zerstören, sie haben, ähnlich wie Detergenzien, einen destabilisierende Effekt. Sie können einzelne Lipide aus der Doppelmembran extrahieren. Diese Daten wurden durch den Befund, dass zelluläre Lipide Bestandteile der Amyloidablagerungen (*in vivo*) sind, bestätigt [89].

Da bei gesunden Menschen die Bindung von IAPP an Membranen nicht zu einem Absterben der β -Zellen führt, müssen bei Diabetikern Bedingungen existieren, welche die Aggregation von IAPP zu toxischen Oligomeren fördern. Aufgrund der Insulinresistenz bei Typ II Diabetikern wird vermehrt Insulin hergestellt. Wie bereits erwähnt, wird Insulin zusammen mit IAPP produziert und sezerniert. Somit führt die Insulinresistenz nicht nur zu einer höheren Produktion und Sekretion von Insulin, sondern könnte auch eine erhöhte IAPP-Sekretion induzieren [91]. Da die Aggregation von der Konzentration abhängig ist, könnte dieser Effekt die Fibrillenbildung auslösen. Durch die Überexpression an IAPP würde die Kapazität der zellulären Schutzsysteme nicht ausreichen, um die Missfaltung zu unterdrücken und die intrazellulären toxischen Oligomere zu neutralisieren [91]. Eine höhere Sekretion von IAPP und die Interaktion mit Membranen könnte die Aggregation außerhalb der β -Zellen fördern. Die extrazelluläre Toxizität von IAPP wurde durch *in vitro* Zellkulturexperimente bestätigt [55].

1.3.2 Design von Inhibitoren der zytotoxischen IAPP-Aggregation

Um den β -Zelltod bei Diabetikern zu unterbinden haben einige Forschergruppen versucht Moleküle zu entwickeln, welche in der Lage sind die toxische IAPP-Aggregation zu blockieren. Einige dieser Inhibitoren sind synthetisch modifizierte kurze IAPP-Peptide, die selbst nicht aggregieren, aber an amyloidogenen hIAPP-Moleküle binden und deren toxische Selbstassoziation unterdrücken können [93, 98]. In unserer Arbeitsgruppe wurden durch die N-Methylierung von zwei Amidbindungen in der Kernsequenz des hIAPPs IAPP-Analoga entwickelt, die eine nicht-amyloidogene und nicht-toxische IAPP-Konformation nachahmen [93, 94]. Diese N-Methylierungsstrategie lässt die intermolekulare Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Amidbindungen unterschiedlicher β -Stränge nur über eine Seite der N-methylierten Sequenz zu [93]. Dies ermöglicht die Bindung der modifizierten IAPP-Sequenzen an das amyloidogene IAPP und die Inhibierung seiner Selbstassoziation zu toxischen Oligomeren und Fibrillen. In Abbildung 1.14 A ist ein Modell der antiparallelen β -Faltblatt-Anlagerung der IAPP-Region 22-28 zu sehen [93]. Durch die Ausbildung dieser Sekundärstruktur befinden sich die Seitenketten der Aminosäuren Asn22, Gly24 und Ile26 auf einer Seite des β -Stranges. Die Seitenketten der Aminosäuren Phe23, Ala25 und Leu27 sind auf der gegenüberliegenden Seite angeordnet. Rechts ist die Blockierung der Anlagerung weiterer β -Stränge durch die N-Methylierung der IAPP-Sequenz an den Amididen der Aminosäuren Gly24 und Ile26 schematisch dargestellt.

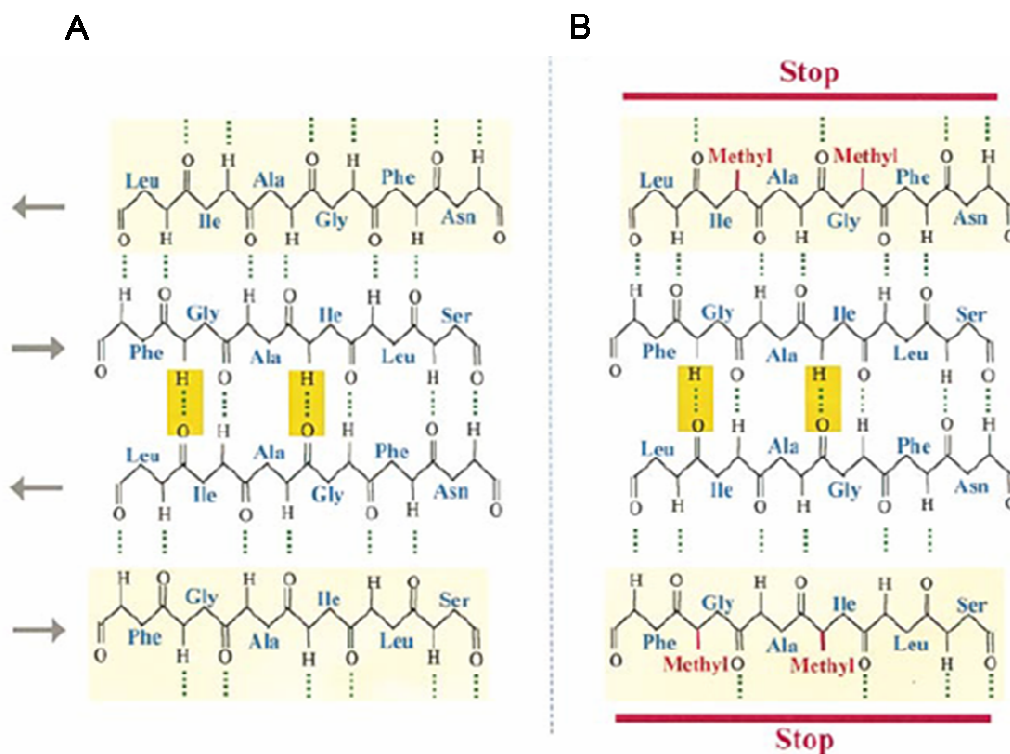


Abbildung 1.14: N-Methylierungsstrategie zur Inhibierung der toxischen Aggregation von hIAPP. (A) Modell für die intermolekulare Wechselwirkung der antiparallelen β -Stränge in der hIAPP-Amyloidkernregion Asn22-Ser28. Die Pfeile links geben die Richtung der einzelnen β -Stränge an. (B) Darstellung der Blockierung der Anlagerung weiterer β -Stränge durch die N-Methylierung der IAPP-Sequenz an den Amididen der Aminosäuren Gly24 und Ile26.

des Mechanismus zur Unterbindung der lateralen β -Faltblatt-Verlängerung. Die N-Methylierungen befinden sich an den Aminosäuren Gly24 und Ile26. Quelle [93].

Basierend auf diesem Modell wurden in unserer Arbeitsgruppe verschiedene kurze Fragmente der IAPP-Kernsequenz an den Aminosäuren Gly24 und Ile26 N-methyliert. Diese Modifizierung führte zu der Unterdrückung ihrer Aggregationsneigung. Im Gegensatz zu den amyloidogenen Ausgangssequenzen konnten die methylierten Fragmente keine toxischen Spezies und Fibrillen ausbilden [92]. Weitere *in vitro* Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass bereits ein Hexapeptid (NFGAIL) der IAPP-Kernsequenz, mit N-Methylierung an Gly24 und Ile26, in der Lage ist die Aggregation des hIAPP (1-37) zu toxischen Spezies und amyloiden Fibrillen zu inhibieren [94]. Um die Affinität des potentiellen Inhibitors an hIAPP (1-37) zu erhöhen und dadurch seine Wirkung zu verbessern, wurde die vollständige IAPP-Sequenz durch die N-Methylierung an den Aminosäuren Glycin und Isoleucin modifiziert (IAPP-GI). Es wurden noch weitere IAPP-Analoga, mit N-Methylierungen an unterschiedlichen Positionen in der Kernsequenz, synthetisiert [95]. Die Sequenzen sind in Abbildung 1.15 A dargestellt. Der Einfluss dieser IAPP-Analoga auf die zytotoxische Aggregation und Fibrillenbildung des amyloidogenen Peptids IAPP wurde in der Doktorarbeit meiner Kollegin Li-Mei Yan untersucht [96]. Anhand von Zellkulturexperimenten, biochemischen und biophysikalischen Messungen sowie elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde festgestellt, dass von den vier Analoga IAPP-GI die toxische IAPP-Selbstassoziation und Amyloidbildung am effektivsten blockieren und die IAPP-Fibrillen wieder auflösen kann [97]. Abbildung 1.15 B zeigt den vorgeschlagenen Mechanismus der inhibitorischen Wirkung des IAPP-Analogons. Zusätzlich wurde festgestellt, dass IAPP-GI ein lösliches, nicht-amyloidogenes, nicht-toxisches und bioaktives IAPP-Analogon ist. Diese IAPP-GI Eigenschaften, als nicht-amyloidogenes IAPP-Analogon und Inhibitor der toxischen IAPP-Aggregation zu wirken, deutet darauf hin, dass dieses Peptid ein vielversprechender Kandidat bei der Entwicklung von Therapeutika für die Behandlung des Typ II Diabetes sein könnte.

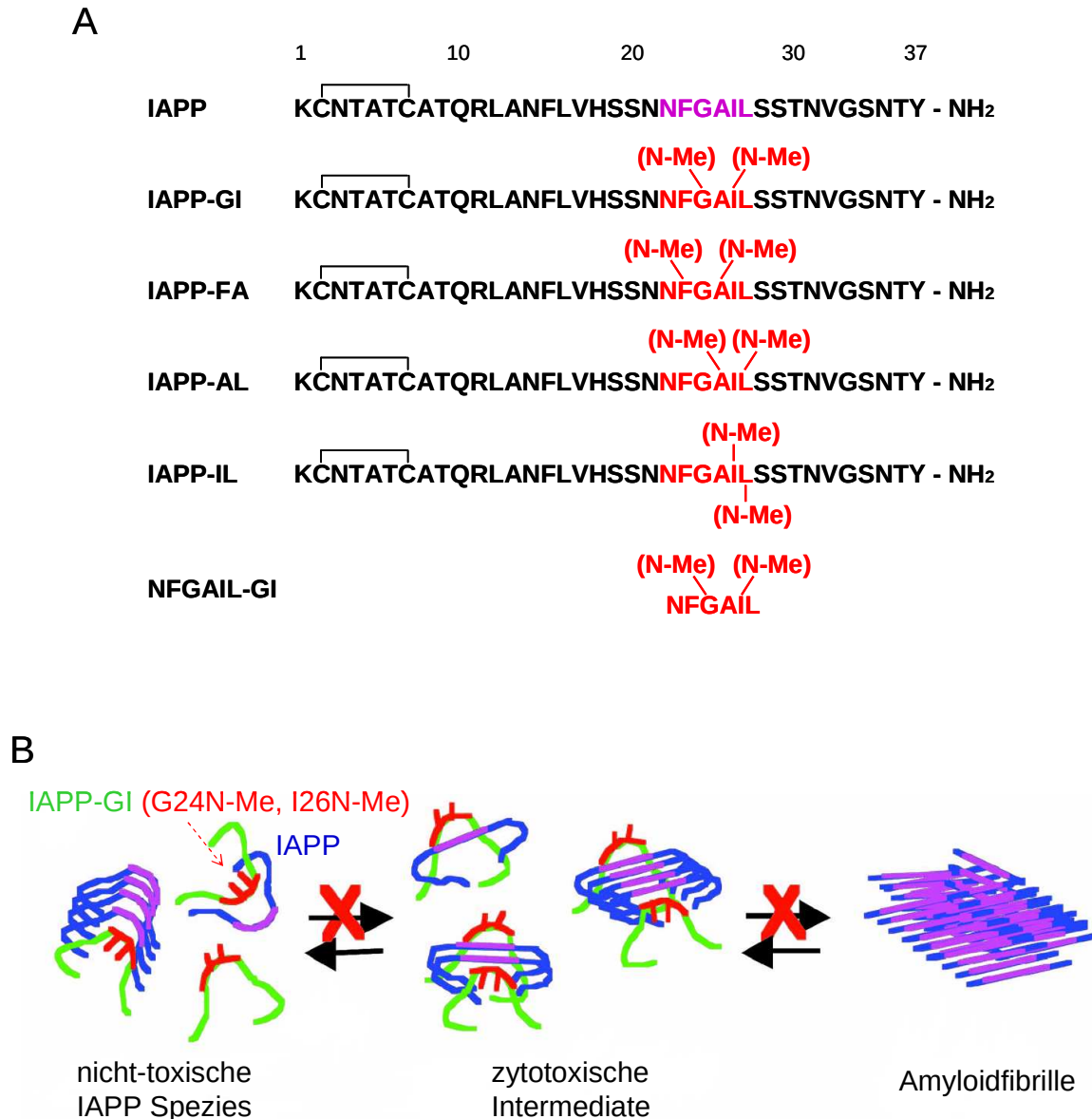


Abbildung 1.15: Primärstrukturen der IAPP-Analoga und schematische Darstellung des vorgeschlagenen Mechanismus der inhibitorischen Wirkung auf die zelltoxische IAPP-Aggregation. IAPP und die IAPP-Analoga IAPP-GI, IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL sind C-terminal amidiert. (A) Die N-Methylierung wurde an den Aminosäuren vorgenommen, welche eine IAPP-Amyloidkernsequenz ausbilden. In diesem Bereich bildet sich also eine β -Faltblattstruktur aus. (B) Durch die Anbindung des Inhibitors an nicht-toxische IAPP-Spezies werden die Entstehung von zytotoxischen Zwischenstufen und die Anbindung von weiteren IAPP-Molekülen zur Ausbildung von fibrillären Strukturen blockiert. Quelle [97].

1.4 Alzheimer-Erkrankung

Laut der Deutschen Alzheimer Gesellschaft leben gegenwärtig etwa 1,1 Millionen Demenzkranke in Deutschland [99]. Unter dem Begriff Demenz versteht man den Verfall der geistigen Leistungsfähigkeit. Zwei Drittel von Ihnen leiden an Alzheimer, eine Krankheit die durch den langsam fortschreitenden Verlust von Nervenzellen und Nervenzellkontakten zunächst mit einer schwachen Vergesslichkeit beginnt und zum vollständigen Verlust wichtiger mentaler Funktionen (Sprach-, Denk-, Urteilsvermögen) sowie der Persönlichkeit führen kann. Im Endstadium verlieren die Patienten die Kontrolle über ihre Körperfunktionen, werden bettlägrig und sind völlig auf die Hilfe anderer angewiesen.

Bereits im Jahr 1907 beschrieb der deutsche Neuropathologe Alois Alzheimer diese Symptome und die typischen Gehirnveränderungen der später nach ihm benannten Krankheit [100]. Bei diesen molekularen Veränderungen im Hirngewebe handelt es sich um extrazelluläre Ablagerungen, auch Plaques genannt, und neurofibrilläre Bündel innerhalb der Nervenzellen [101].

Die Plaques bestehen hauptsächlich aus fibrillären Strukturen des so genannten Amyloid- β -Peptids. Seine Funktion, die Abspaltung aus einem Vorläuferprotein, seine Aggregation und toxische Wirkung werden näher im Kapitel 1.4.1 beschrieben.

Den Hauptbestandteil der Neurofibrillenbündel bildet das Protein Tau, ein zum Zellskelett gehörendes Protein, das zur Stabilisierung der Mikrotubuli dient. Letztere sind für die Transportvorgänge der Zellen notwendig [102, 103]. Tau liegt bei der Alzheimer-Krankheit in einer hyperphosphorylierten Form dar [104]. Diese abnormale Phosphorylierung fördert dessen Aggregationsneigung zur Ausbildung gepaarter helikaler Filamente, die weiter zu ungeordneten Neurofibrillenbündel assoziieren. Aufgrund der Hyperphosphorylierung kann Tau nicht mehr seine Funktion erfüllen. Die Destabilisierung der Mikrotubuli führt zu einer Unterversorgung der Axonenden und somit zum Zelltod [105].

Bei der Alzheimer-Demenz (AD) wird zwischen zwei Formen unterschieden. Die sporadische oder auch so genannte Spätform kommt am häufigsten vor. Hier tritt die Krankheit ab dem 65. Lebensjahr ein. Bei der erblich bedingten Frühform, die äußerst selten ist, zeigen sich die ersten Symptome bereits in der vierten Lebensdekade. Die genetischen Faktoren sind unter Kapitel 1.4.2 beschrieben.

Eine Heilung der AD ist derzeit nicht möglich. Je früher die Erkrankung erkannt und behandelt wird, desto besser ist die Chance, den Krankheitsprozess zu verlangsamen. Es wird angenommen, dass die Zelldegeneration bereits mehrere Jahre bevor die ersten Symptome auftreten stattfindet. Dies erschwert die rechtzeitige Erkennung der Krankheit. Früher konnte AD erst nach dem Tod eines Patienten durch die typischen Ablagerungen im Gehirn mit letzter Sicherheit festgestellt werden [106]. Heutzutage werden zur Diagnose neben neuropsychologischen Tests und Plasmamarkern (Amyloid- β - und Tau-Protein)

hauptsächlich bildgebende Verfahren, wie die Computer- oder Magnetresonanztomographie, eingesetzt.

1.4.1 Amyloid- β -Peptid

Die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques ist das aus 39 bis 42 Aminosäuren bestehende Amyloid- β -Peptid (A β) [107]. A β ist ein endogenes Peptid, das auch unter physiologischen Bedingungen gebildet und konstitutiv sowohl von Neuronen als auch von anderen Gehirnzelltypen wie Astrocyten, Mikroglia oder Endothelialen und glatten Muskelzellen sekretiert wird [108, 109]. Das Amyloid- β -Peptid wurde auch in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Plasma gesunder Menschen nachgewiesen [110, 111]. Seine Produktion wurde als Teil eines negativen Feedbacks beschrieben, das die Erregbarkeit der Neuronen kontrolliert und sie dadurch vor übermäßiger, schädlicher Aktivität schützt [112]. Die genaue Funktion des Amyloid- β -Peptids ist jedoch noch unbekannt. Ein Ungleichgewicht zwischen seiner Produktion und seines Abbaus, das zu einer erhöhten A β -Konzentration führt, könnte seine Fehlfaltung und Aggregation zu toxischen Spezies und Amyloidfibrillen auslösen.

a) Bildung des A β -Peptids

Das Amyloid- β -Peptid ist ein Spaltprodukt eines größeren Proteins, des sogenannten Amyloid-Vorläufer-Proteins (Amyloid Precursor Protein, APP) [113-116]. APP ist unter anderem an der Zelladhäsion [117], Signaltransduktion [118], Zellmigration [119] beteiligt und ist essentiell für den axonalen Transport in Neuronen [120-122].

Als integrales Membranprotein besitzt APP eine Transmembrandomäne mit einem großen extrazellulären N- und einem kleinen intrazellulären C-Terminus (Abbildung 1.16). Auf dem sekretorischen Transportweg und an der Zelloberfläche kann APP mehrfach gespalten werden. Unter physiologischen Bedingungen wird APP vorwiegend durch die Enzyme α -Sekretase, das APP innerhalb der A β -Sequenz schneidet (Abbildung 1.16 (4)), und γ -Sekretase gespalten [123]. Die γ -Sekretase ist ein Multiproteinkomplex aus den Proteinen Presenilin 1 und 2, Nicastrin, Pen-2 und Aph-1 [124, 125], das APP innerhalb der Membran schneidet (Abbildung 1.16 (2e, 2d)). Bei der Alzheimer-Erkrankung ist der Abbau von APP zugunsten des β -sekretorischen Wegs verschoben. Anstelle der α -Sekretase schneidet das Enzym β -Sekretase (beta-site APP-cleaving enzyme, BACE) vermehrt APP in Kombination mit der γ -Sekretase. Durch unterschiedliche Schnittstellen der γ -Sekretase können beim β -sekretorischen Weg A β -Produkte verschiedener Längen (39 bis 42 Aminosäuren) entstehen. Die Spaltprodukte, die am häufigsten bei der Alzheimer-Krankheit vorkommen, sind A β (1-40) und A β (1-42).

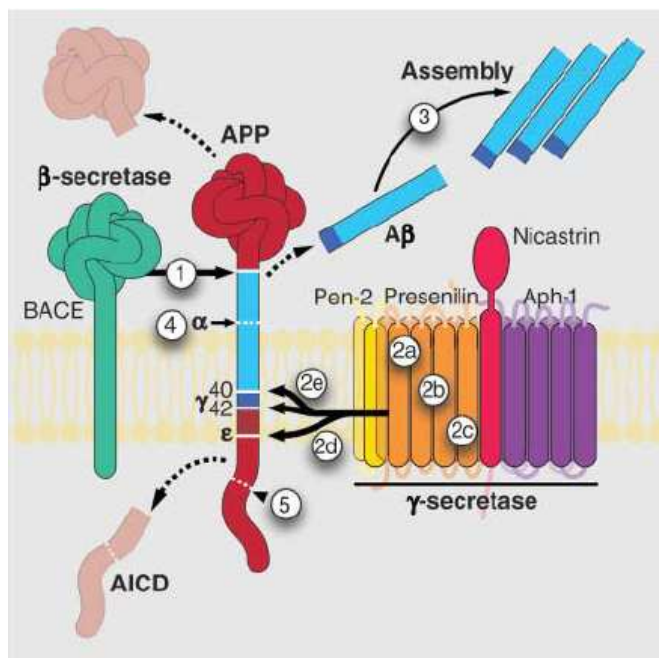


Abbildung 1.16: APP Metabolismus. APP ist ein Transmembranprotein mit einer großen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen, zytoplasmatischen Domäne. Die A β Sequenz besteht aus Teilen der Ekto- und Transmembrandomäne von APP. In Anwesenheit des APP Ligands Kupfer (Cu II) spaltet die α -Sekretase (4) innerhalb der A β Domäne von APP und verhindert die A β Bildung. In Abwesenheit von Cu (II) spaltet überwiegend zuerst die β -Sekretase (1) und setzt den N-Terminus der A β Sequenz frei [126]. Nach Spaltung durch die γ -Sekretase (2e) innerhalb der Transmembrandomäne werden hauptsächlich zwei A β -Sequenzen freigesetzt: A β (1-40) und A β (1-42). 2a bis 2c markieren die Bindungsstellen der Substrate. Eine weitere Funktion der γ -Sekretase ist den

zytoplasmatischen Bereich (APP intracellular domain AICD) freizusetzen (2d), das durch eine Kaspase weiter gespalten wird (5). Erreicht A β eine bestimmte Konzentration aggregiert es in Form von Faltblattstrukturen zu Fibrillen (3), die sich zu Amyloid-Plaques zusammenlagern. Quelle [127].

b) Aggregation und Toxizität der A β -Peptide

Die Amyloid- β -Peptide sind lösliche Produkte des zellulären Stoffwechsels, welche im niederen nanomolaren Bereich in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Plasma vorkommen [108, 128]. A β (1-40) und A β (1-42) neigen zur Fehlfaltung und Aggregation, die unter bestimmten Bedingungen wie durch eine Änderung der Umgebung (pH-Wert, Ionenstärke), die Erhöhung der A β -Konzentration oder durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen ausgelöst werden kann [129]. A β (1-42) hat im Vergleich zu dem um zwei Aminosäuren kürzeren Fragment 1-40 eine stärkere Tendenz zur Aggregation [130-132].

Die Charakterisierung der A β -Konformation unter physiologischen Bedingungen wird durch seine Neigung zur Selbstassoziation erschwert, die bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich stattfindet [133]. Anhand von Circular Dichroismus (CD)- und NMR-Messungen bei denen Versuchsbedingungen gewählt wurden, die den monomeren Zustand von A β (1-40) und A β (1-42) stabilisieren, konnte ein hoher α -helikaler Strukturanteil nachgewiesen werden. Auslöser der A β -Aggregation zur Ausbildung von Amyloidfibrillen ist der konformationelle Übergang vom α -helikalen Zustand in die β -Faltblattstruktur [134]. Der Aminosäureabschnitt mit der Sequenz KLVFF (16-20) wurde als Bindungsdomäne (Kernsequenz) der A β -Selbstassoziation beschrieben [135]. Anhand von Festkörper-NMR-Messungen wurde gezeigt, dass nicht nur das kleine A β -Fragment (16-20), sondern auch die größeren Abschnitte 9-21 und 30-40, eine β -Faltblatt Konformation einnehmen können [136].

Zunächst wurden die A β -Fibrillen als Auslöser für die Neurodegeneration bei der Alzheimer-Erkrankung betrachtet [137]. Untersuchungen mit transgenen Mäusen, die humanes APP exprimierten, sowie Studien an AD-Patienten zeigten jedoch, dass der neuronale Zellverlust und die eingeschränkte Gedächtnisfunktion nur schwach mit der Plaque-Ablagerung im Gehirn korrelierten [138-140]. Mittlerweile ist bekannt, dass niedermolekulare A β -Aggregationsformen auch eine toxische Wirkung haben [141-145]. Dazu gehören kleine Oligomere – die Amyloid-beta derived diffusile Ligands (ADDLs) – und Protofilamente, auch Protofibrillen genannt. In Abbildung 1.17 ist der nukleationsabhängige Aggregationsprozess und die verschiedenen A β -Spezies, die während der Selbstassoziation gebildet werden, dargestellt.

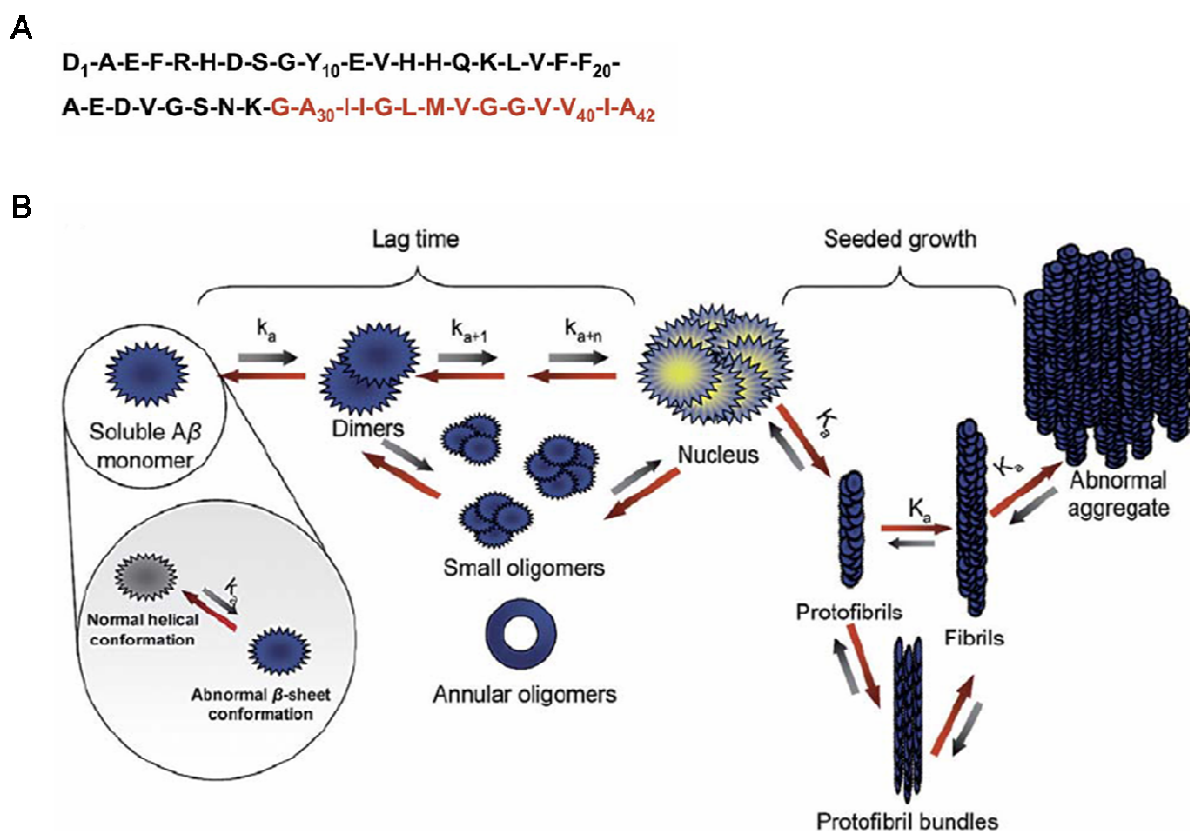


Abbildung 1.17: Aminosäuresequenz und Aggregationsprozess des Amyloid- β -Peptids. (A) Primärstruktur der Peptide A β (1-40) und A β (1-42). Der hydrophobe C-Terminus ist rot markiert. (B) Schematische Darstellung der A β -Aggregation zu toxischen Spezies und der Fibrillogenese als ein nukleationsabhängiger Prozess. Um die Selbstassoziation initiieren zu können müssen lösliche A β -Monomere eine β -Faltblatt Konformation einnehmen. Im Verlauf der Aggregation werden kleine Oligomere, Protofibrillen und größere Proteinablagerungen gebildet. Kleine globuläre und annuläre Oligomere weisen unter den verschiedenen A β -Spezies die größte Neurotoxizität auf. Quelle [146].

Monomere A β -Moleküle mit einer β -Faltblattstruktur neigen dazu sich schnell zu oligomeren Aggregaten zusammenzulagern [147, 148]. Es werden lösliche Oligomere gebildet, die aus 3 bis 50 Monomeren bestehen und keine fibrillären Strukturen aufweisen [146]. Die ADDLs wurden sowohl bei *in vitro* Studien als auch in Extrakten des Gehirns nachgewiesen [146].

Die annulären, porenartigen Aggregate wurden bisher nur *in vitro* beobachtet. Es wird vermutet, dass diese Oligomere aufgrund ihrer Struktur unregulierbare Ionenkanäle in Zellmembranen ausbilden können [146]. Die Protofibrillen besitzen bereits geringe Anteile an β -Faltblattstrukturen und bilden die Vorstufen des fibrillären A β [149, 150]. Daten aus Zellkultur- und Tiermodellen bestätigten, dass A β bereits im prä-fibrillären Zustand die Funktion von Neuronen beeinträchtigen kann [143, 144, 150, 152]. Es wurde gezeigt, dass oligomere Strukturen spezifisch an die Oberfläche von Dendriten und Synapsen binden, was zu einer Störung der synaptischen Funktion führen kann [151].

Oligomere und protofibrilläre A β -Strukturen wurden im Gehirn, Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit von AD-Patienten nachgewiesen, was auf eine Rolle dieser Formen bei der Krankheitsentstehung hinweist [153].

1.4.2 Die Amyloid-Kaskade-Hypothese und der Einfluss genetischer Faktoren

Das Modell der Amyloid-Kaskade stellt einen molekularen Zusammenhang zwischen den toxischen A β -Spezies und der Zelldegeneration dar. Die Amyloid-Kaskade-Hypothese wurde 1992 von Hardy und Higgins aufgestellt [137]. Nach Entdeckung der toxischen prä-fibrillären A β -Spezies wurde sie modifiziert und ist durch zahlreiche Untersuchungen gestützt [154].

Ausgangspunkt der Kaskade ist eine erhöhte A β -Konzentration, die auf eine höhere Produktionsrate oder auf einen verminderten Abbau der A β -Peptide zurückzuführen ist. Auf eine zentrale Rolle der A β -Bildung bei der Krankheitsentstehung wurde durch folgende Entdeckungen hingewiesen: bei der vererbaren AD wurden Mutationen an drei Genen entdeckt, die zu einem früheren Ausbruch und einem schnelleren Fortschreiten der Symptome führen. Die identifizierten Gene kodieren das Vorläuferprotein APP [155-158] und die Transmembranproteine Presenilin-1 und Presenilin-2 [159-162] der γ -Sekretase. Alle bekannten Mutationen dieser Gene führen entweder zu einer Überproduktion von A β (1-42) oder zu einer erhöhten Sekretion [163]. Anhand dieser Feststellung wurde die Hypothese aufgestellt, dass die hydrophobere A β -Sequenz (1-42) durch ihre hohe Aggregationsneigung den eigentlichen Aggregationskeim darstellt und die Umwandlung des A β (1-40) von seiner löslichen in die aggregierende Form katalysiert. Wird APP in Mäusen oder Zellkulturen überexprimiert, so entsteht sowohl mehr A β (1-40) als auch A β (1-42), und die Aggregation wird insgesamt beschleunigt [164].

Ein weiteres Gen, das die Entwicklung von sporadischen Fällen der AD beeinflusst, ist das ApoE-Gen, das ein am Cholesterintransport beteiligtes Protein kodiert [165]. Menschen mit einer bestimmten Genvariante des Apolipoproteins E (ϵ 4-Isoform) haben ein größeres Risiko im Alter an AD zu erkranken [166]. Laborexperimente ergaben, dass ApoE an das Amyloid- β -Protein binden kann und dadurch die Aggregation des Proteins mit sich selbst fördert [167-169].

Zellkulturstudien und Tierexperimente deuten drauf hin, dass lösliche A β -Oligomere die Reizweiterleitung an Synapsen beeinträchtigen [170-173], was zu einer Entgleisung des intrazellulären Ca²⁺-Gleichgewichts [174] und zu oxidativem Stress führt [175, 176]. Der Veränderte Ca²⁺-Spiegel löst die Hyperphosphorylierung und Ablagerung des Tau-Proteins aus [177, 178].

Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Amyloid-Plaques Mikrogliazellen aktivieren können, die daraufhin neurotoxische Faktoren, wie TNF- α (tumor nekrosis factor α), Zytokine und freie Radikale sekretieren [179-182].

Sowohl die Neurofibrillenbündel des Tau-Proteins, deren Bildung durch toxische A β -Spezies ausgelöst wird, als auch die beschriebene Entzündungsreaktion führen zum Funktionsverlust und Zelltod der Neuronen, was als unmittelbare Ursache der Alzheimer-Demenz angesehen wird.

1.4.3 Therapie

Eine Heilung der Alzheimer-Krankheit ist derzeit noch nicht möglich. Mit den vorhandenen Medikamenten lässt sich zwar der Verlauf der Erkrankung verzögern, aufhalten kann man sie damit jedoch nicht. Diese Medikamente beinhalten Acetylcholinesterase-Hemmer, die den Signalaustausch zwischen den überlebenden Nervenzellen verbessern. Durch eine frühzeitige Therapie können einzelne Symptome, wie der Gedächtnisverlust oder Verhaltensstörungen gemindert werden [183].

Bei mittelschweren bis schweren Alzheimer-Demenzen wird der N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptorantagonist Memantin eingesetzt. Dieser Wirkstoff schützt die Nervenzellen vor einer Überreizung durch den Botenstoff Glutamat, die zum Zelltod führt. Auch hier trägt die Wirkung nur zu einer Verbesserung der krankheitsbedingten Symptome bei [184].

Durch die Erforschung der molekularen Ereignisse und Moleküle, die für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit verantwortlich sind, soll es ermöglicht werden präventive Therapieansätze zu entwickeln, die die Entstehung und Aggregation des amyloidogenen A β -Peptids unterbinden oder bereits vorhandene Amyloid-Ablagerungen abbauen.

Die A β -Produktion kann durch die Inhibierung der β - und γ -Sekretase gestoppt werden. Entsprechende Hemmstoffe wurden bereits entwickelt [185-187], allerdings eignen sich nur einige dieser Substanzen für klinische Tests, da die Sekretasen viele verschiedene Proteine schneiden, weshalb ihre Blockade zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen führen kann [185, 188, 189].

Mittlerweile wurden auch Moleküle entdeckt, die in der Lage sind die Enzymaktivität der γ -Sekretase zu Gunsten der weniger amyloidogenen A β -Fragmente zu verändern [190, 191]. Statt A β -(1-42) wird vermehrt solches mit 39 Aminosäuren produziert. Derzeit werden diese Substanzen in klinischen Studien getestet.

Diverse kleine Moleküle wurden entdeckt, die das A β -Peptid in seinem korrekten Zustand stabilisieren und dadurch seine Oligomerisation zu toxischen Spezies verhindern [192, 193]. Die Wirkung eines Glycosaminyglycan-Mimetikums und des Zinkchelators Clioquinol werden bereits in der Phase II klinischer Studien untersucht [194].

Um die bereits vorhandenen schädlichen A β -Aggregate wieder abzubauen, wurden immunologische Ansätze untersucht. Eine aktive Immunisierung mit einem β -Amyloid-Fragment führte in einer Studie bei Alzheimer-Patienten zwar zu einer Reduktion der Ablagerungen im Hirn, bei etwa sechs Prozent aber auch zu einer Hirnhautentzündung [195]. Um eine akute Immunreaktion zu verhindern, die zur Meningoenzephalitis führte, werden derzeit passive Impfungen mit monoklonalen Antikörpern in klinischen Test untersucht [196-200].

Anhand der hier vorgestellten Therapieansätze besteht die Hoffnung potentielle Wirkstoffe und Methoden zu entdecken, die den allmählichen Verlust von Hirnzellen eindämmen oder sogar ganz aufhalten können, was Millionen von Menschen vor einem Alzheimer-Schicksal bewahren würde.

1.5 Insulin-Aggregation

Weltweit leiden etwa 230 Millionen Menschen an Diabetes mellitus [201]. Davon sind ca. 10 % Typ I Diabetiker, die aufgrund eines absoluten Insulinmangels lebenslang auf Insulininjektionen angewiesen sind. Im Gegensatz dazu besteht beim Typ II Diabetes nicht grundsätzlich ein Mangel an Insulin, jedoch wird bei vielen Fällen die Behandlung mit Insulin als eine geeignete Therapieform angesehen.

Nach Schätzungen der WHO werden weltweit jährlich 6 Tonnen dieses Hormons benötigt [202]. Erst die Gentechnik machte es möglich, humanes Insulin in den Mengen herzustellen, die eine therapeutische Nutzung erfordert. Davor war man auf tierisches Insulin angewiesen, das aus den Bauchspeicheldrüsen von Schweinen und Rindern isoliert wurde.

Trotz dieser Therapieform haben Diabetiker chronisch erhöhte Blutglucosewerte, die langfristig durch mikro- und makrovaskuläre Schädigungen zur Erblindung, Nierenversagen sowie zu einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen führen. Dies ist auf die Eigenschaft von Insulin zurückzuführen, welches bei hohen lokalen Konzentrationen, die bei subkutanen Injektionen erreicht werden, zunächst in Form von Hexa- und Tetrameren vorliegt und allmählich zu den bioaktiven Monomeren dissoziiert [203]. Die Folge ist ein verspäteter Einsatz der Insulinwirkung was zu einer Hyperglykämie führt.

Um den Blutglucosespiegel bei Diabetikern möglichst in einem physiologischen Rahmen zu halten, wurden Insulinanaloga entwickelt. Durch den Austausch verschiedener Aminosäuren wurden schnell oder langsam wirkende Insuline hergestellt [204]. Nach dem neuen Konzept der Insulintherapie werden Kurzzeitinsuline zu den Mahlzeiten gegeben, um den Anstieg der

Blutglucose auszugleichen. Langsam wirkende Insuline sollen die Grundversorgung mit Insulin insbesondere während der Nacht sicherstellen.

Eine weitere Eigenschaft des Insulins, unlösliche hochmolekulare Aggregate auszubilden, erschwert nicht nur die therapeutische Anwendung, sondern stellt auch ein großes Problem bei der Lagerung und vor allem dessen Produktion dar [205]. Die unlöslichen Komplexe verringern die Konzentration der Insulinpräparate und können die Kanülen und Schläuche der Insulinpumpen während einer kontinuierlichen Insulin-Infusion verstopfen [206]. Vor allem schnell wirksame Insulinanaloga, deren hexamere Form destabilisiert ist und die Moleküle hauptsächlich als Monomere vorliegen, zeigen eine erhöhte Aggregationsneigung. Im Gegensatz dazu weist das Normalinsulin durch die Ausbildung von zinkhaltigen Hexameren, eine höhere Stabilität auf.

Zusätzlich wurden subkutane amyloidogene Insulinablagerungen bei Diabetikern nach wiederholten Insulininjektionen und kontinuierlichen Insulininfusionen beobachtet [207-209]. Während der biotechnologischen Prozesse, wie der Proteinisolierung und -aufreinigung, führt die Aggregation von Insulin zu einer Verringerung der Ausbeute und zu einem Verlust der biologischen Aktivität des Proteins [205]. Auch während des Transports und der Lagerung können proteinbasierte pharmazeutische Produkte durch Aggregationsprozesse inaktiviert werden [210, 211]. Ausgelöst wird die Insulin-Aggregation durch physikalische, chemische und mechanische Faktoren, wie erhöhte Temperaturen, UV-Einstrahlungen, niedrige pH-Werte, Metallionen-Kontaminationen oder schüttelnde Bewegungen.

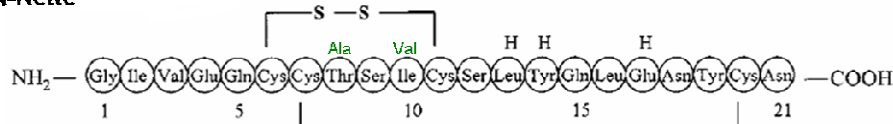
Trotz intensiver Forschung ist der Aggregationsprozess des Insulins nicht vollständig geklärt. Die Untersuchung des molekularen Mechanismus ist nicht nur von wirtschaftlichem Interesse. Die Entwicklung von Strategien, die zu einer Unterbindung der unerwünschten Aggregation führen, würde die Anwendbarkeit der Insulinpräparate bei ihrer therapeutischen Anwendung verbessern.

1.5.1 Biosynthese und Struktur des Insulins

Insulin ist ein Peptidhormon, das zusammen mit Glukagon den Zuckerstoffwechsel reguliert [204]. Es besteht aus einer 21 Aminosäuren langen A-Kette und einer 30 Aminosäuren langen B-Kette (Abbildung 1.18). Beide Polypeptidketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Zusätzlich ist eine intramolekulare Disulfidbrücke in der A-Kette vorhanden. Insulin wird als Prä-Pro-Insulin in den B-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet. Dieses Vorläuferprotein besteht aus einem Signalpeptid, der B-Kette, dem C-Peptid („connecting peptide“) und der A-Kette. Das Signalpeptid sorgt für das Importieren des Insulins in das Endoplasmatische Retikulum und wird bei diesem Prozess abgespalten. Das resultierende Pro-Insulin wird in den sekretorischen Vesikeln durch die Abspaltung des C-Peptids weiter prozessiert. Reifes Insulin wird in Form von zinkhaltigen Hexameren in den Vesikeln gespeichert und durch Exozytose als Antwort auf eine Erhöhung

des Blutzuckerspiegels freigesetzt. Das sezernierte Insulin dissoziiert infolge der starken Verdünnung zuerst zu Tetra- und Dimeren, die letztendlich in die bioaktive monomere Form übergehen.

A-Kette



B-Kette

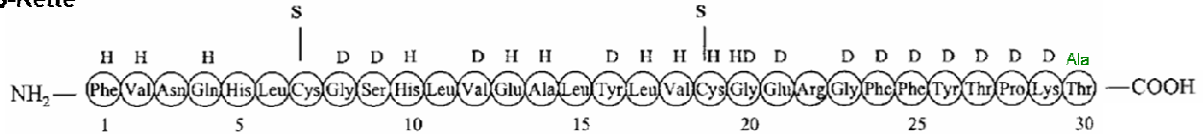


Abbildung 1.18: Primärstruktur des Humaninsulins. Die Buchstaben D und H markieren Aminosäuren die an der Assoziation zu Dimeren und/oder Hexameren beteiligt sind. Die grün markierten Aminosäuren stellen die Sequenzunterschiede zwischen Human- und Rinderinsulin dar. Quelle [212].

1969 wurde die dreidimensionale Struktur des Insulins anhand von Röntgenstrukturanalysen beschrieben [213]. Beide Insulinketten bilden Sekundärstrukturelemente aus. Die A-Kette besteht aus zwei α -Helices in den Sequenzbereichen A1-A8 und A12-A19. Die B-Kette bildet zwei β -Stränge, B1-B5 und B24-B28 und eine α -Helix im Bereich B9-B19 aus.

Unter physiologischen Bedingungen liegt ein Gleichgewicht zwischen den mono-, di-, tetra- und hexameren Insulinspezies vor. An der Ausbildung von dimeren Strukturen sind vor allem die C-terminalen β -Stränge (B24-B28) der Insulinmonomere beteiligt, die im Dimer ein antiparalleles β -Faltblatt ausbilden (Abbildung 1.19 B). Hexameres Insulin besteht aus drei Dimeren und wird durch zwei Zinkionen stabilisiert, die mit den Histidinen (B10) im Inneren des Oligomers wechselwirken (Abbildung 1.19 C).

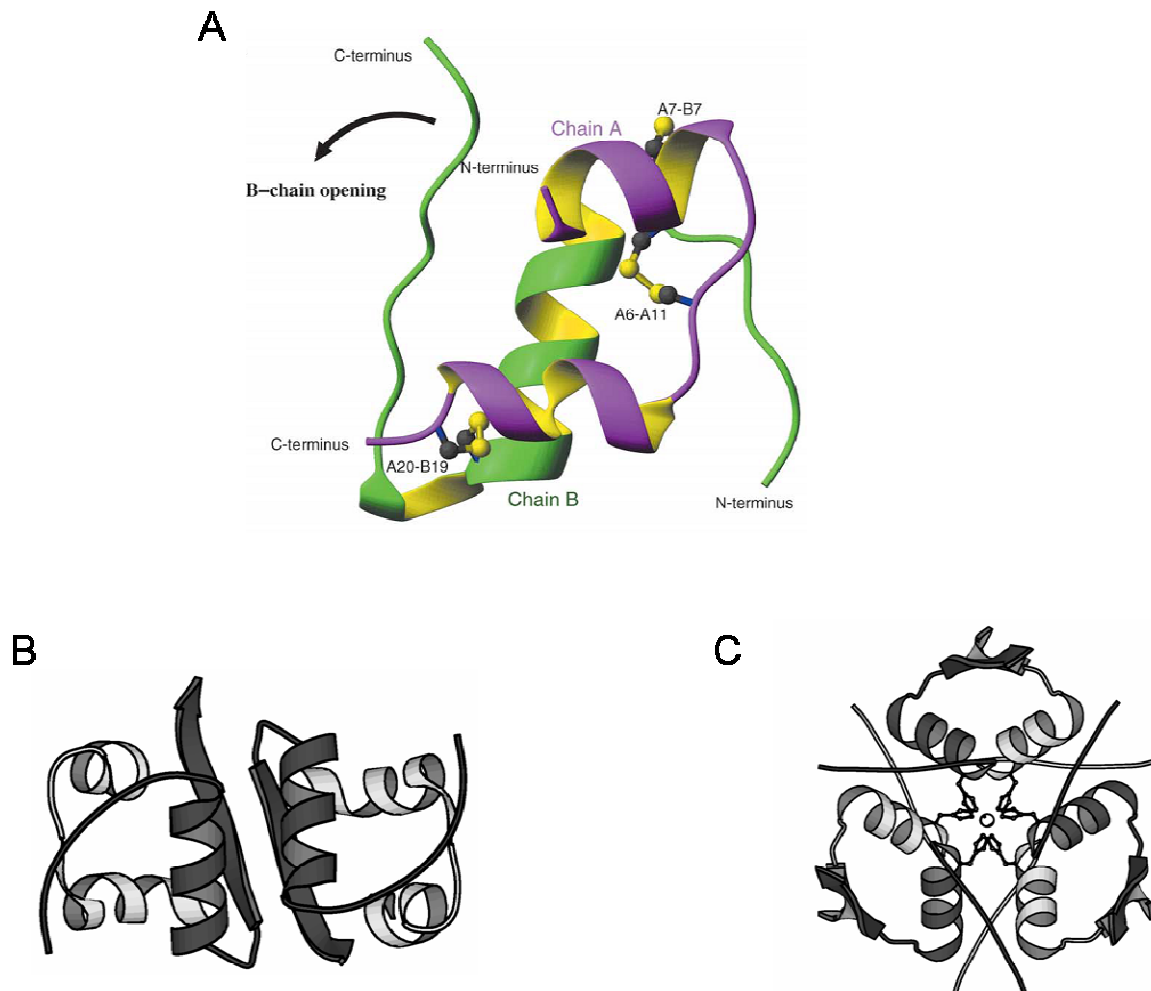


Abbildung 1.19: 3-D Strukturen der Insulinmonomere, -di- und -hexamere. (A) Bänderdiagramm des monomeren Insulins. Anhand der kompakten Anordnung der α -helikalen Sekundärstrukturelemente besitzt das Insulin eine globuläre Struktur, die durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird. Der Pfeil zeigt die Flexibilität des C-Terminus der B-Kette (grün). Es wird angenommen, dass durch die Öffnung der B-Kette der N-terminale Bereich der A-Kette freigegeben wird, der für die Interaktion mit dem Insulinrezeptor von Bedeutung ist. Die molekulare Struktur wurde anhand von Daten, die mit der Kernresonanzspektroskopie und Röntgenstrahlkristallographie ermittelt wurden, erstellt. Hierfür wurde das Programm MOLMOL verwendet. Quelle [214]. (B) Bänderdiagramm eines Insulindimers und -hexamers (C). Die C-terminalen β -Stränge (B24-B28) beider Monomere sind an der Dimerisierung beteiligt und bilden ein antiparalleles β -Faltblatt aus. Hexameres Insulin wird durch zwei Zinkionen stabilisiert, die im Zentrum mit den Histidinen (B10) wechselwirken. Die Strukturen in (B) und (C) basieren auf mittels Röntgenstrahlkristallographie ermittelte Daten und wurden mit dem Programm MOLSKRIPT erstellt. Quelle [215].

1.5.2 Bildung von präfibrillären Strukturen und Amyloidfibrillen

Bisherige *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass Bedingungen die eine Destabilisierung der di- und hexameren Strukturen und somit die Bildung von monomeren Insulinmolekülen begünstigen, die Aggregation und Fibrillenbildung von Insulin fördern [216-218]. Dies kann z.B. durch niedrige pH-Werte, hohe Temperaturen oder die Anwesenheit von Denaturantien erreicht werden. Anhand weiterer Studien wurde festgestellt, dass nach der Dissoziation der nativen Insulin-Oligomere partiell entfaltete Intermediate gebildet

werden, die eine Aggregation zu Amyloidfibrillen auslösen können [216, 219, 220]. Es wurde angenommen, dass bei der Entfaltung des monomeren Insulins hydrophobe Bereiche exponiert werden, die in der nativen Struktur verborgen sind [221]. Der Aggregationsprozess wurde als nukleationsabhängiger Mechanismus beschrieben [221] und die cross- β -Struktur der Insulinfibrillen wurde bereits 1972 durch Burke und Rougvié nachgewiesen [222]. Die Struktur der monomeren Intermediate und die des oligomeren Nukleus konnten bis jetzt jedoch noch nicht vollständig charakterisiert werden. Analysen mittels CD- und Infrarot-Spektroskopie belegten den konformationellen Übergang von α -helikalen zu β -Faltblatt-Strukturen, der charakteristisch für die Aggregation von globulären Proteinen zu Amyloidfibrillen ist [223].

Es wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Insulin-Aggregation zu unterbinden und damit die therapeutische Anwendung des Insulins zu verbessern. Durch den Zusatz von Glycerol oder Mannitol und ähnlichen Zuckern konnten neutrale Insulinlösungen stabilisiert werden [221]. Chemische Reaktionen dieser Zusätze mit den Aminosäureseitenketten des Insulins führten jedoch zu einer Reduktion der Bioaktivität des Peptidhormons. Grenzflächenaktive Substanzen wie Lecithin sind in der Lage an hydrophobe Regionen zu binden und somit unerwünschte Wechselwirkungen, die zur Insulin-Aggregation führen können, zu blockieren [221]. Der Zusatz von überschüssigem Zink kann ebenfalls die Stabilität von monomerem Insulin erhöhen, indem vorwiegend Hexamere gebildet werden [221]. Oft reichen diese Stabilisierungsmethoden jedoch nicht aus um die Haltbarkeit der Insulinlösungen bei Raum- und Körpertemperatur zu verbessern und sie bieten keinen ausreichenden Schutz vor mechanischen Belastungen. Vor allem zinkfreie, schnell wirksame Insulinpräparate sind besonders anfällig für physikalischen Stress.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der Arbeitsgruppe wurden, durch eine Modifikation der Sequenz des Inselamyloid-Polypeptids (IAPP), vier IAPP-Analoga entwickelt. Anhand eines Analogon wurde erfolgreich gezeigt, dass durch die N-Methylierung zweier bestimmter Amidbindungen das Peptid in seiner Flexibilität eingeschränkt wird und nicht mehr in Lage ist amyloide und toxische Konformationen auszubilden [97]. Diese modifizierte Sequenz hat zusätzlich die Eigenschaft die toxische IAPP-Oligomerisierung und Fibrillenbildung zu unterdrücken. Bereits gebildete Aggregate können teilweise wieder aufgelöst werden. Der Einfluss dieser Sequenzmodifikationen auf die Selbstassoziationstendenz der Analoga und der Bindungsaffinität an IAPP wurde noch nicht untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit ist es einen Fluoreszenz-Bindungsassay zu etablieren, um die Affinität der Selbstassoziation von IAPP und dessen Analoga zu bestimmen. Die Affinität der Wechselwirkung der IAPP-Analoga mit IAPP soll anhand dieser Methode ebenfalls untersucht werden.

Aus den Studien anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass amyloide Peptide nicht nur fibrilläre Aggregate mit einer ähnlichen Struktur ausbilden, sondern auch Gemeinsamkeiten bezüglich der Konformation und der toxischen Wirkung ihrer prä-fibrillären Spezies aufweisen [53, 48, 249]. Aufgrund dieser Feststellung und der Tatsache, dass die Sequenzen des IAPP und des Amyloid- β -Peptids ($A\beta(1-40)$) der Alzheimer-Demenz zu 25 % identisch und zu 50 % ähnlich sind, soll im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung der IAPP-Analoga auch auf die Bildung zelltoxischer Aggregate der Amyloid- β -Peptide $A\beta(1-40)$ und $A\beta(1-42)$ untersucht werden.

Des Weiteren wurde anhand von *in vitro* Studien gezeigt, dass Insulin an IAPP binden und dessen Fibrillogenese inhibieren kann [61, 62, 250-252]. Dies könnte ein natürlicher Mechanismus sein, der die IAPP-Moleküle stabilisiert und dessen Aggregation in den sekretorischen Vesikeln blockiert. Diese Hypothese führte zu der dritten Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Es soll untersucht werden, ob die IAPP-Analoga an Insulin binden und dessen Aggregation auch hemmen können. Falls eine inhibitorische Wirkung zu sehen wäre, sollte daraufhin untersucht werden inwiefern die biologische Aktivität des Insulins durch die Wechselwirkung mit den IAPP-Analoga und IAPP beeinflusst wird.

2 Material und Methoden

Die Herstellung sämtlicher Pufferlösungen erfolgte mit destilliertem Wasser, welches über eine Milli-Q Biocel A10 Anlage (Millipore, Schwalbach) aufbereitet wurde. Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität verwendet.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse und statistischen Analyse wurde das Programm Origin (OriginLab, Northampton, USA) verwendet.

2.1 Chemikalien

Substanz (Reinheitsgrad)	Hersteller
Acetonitril (> 99,95 %)	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
Aminosäuren (nicht-essentielle)	Gibco/Invitrogen (Eggenstein)
AgNO ₃	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Biotin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Citronensäure-Monohydrat	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
DIEA (> 99,5 %)	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
7-Diethylaminocoumarin-3-Carbonsäure	Invitrogen (Eggenstein)
DMF (> 99,8 %)	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
DMEM	Invitrogen (Eggenstein)
DTT	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethandithiol (> 98 %)	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
FCS	Invitrogen (Eggenstein)
Fmoc-Aca-OH,	Novabiochem/Merck (Darmstadt)
Fluorescein (5,6)-isothiocyanat	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
Formaldehyd (37 % (v/v) in H ₂ O)	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glucose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Guanidinium-HCl	Roth (Karlsruhe)
HCl (37 % (v/v) in H ₂ O)	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)

HFIP (> 99,8 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
HEPES	Merck (Darmstadt)
Isopropanol (> 99 %)	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
KCl	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Invitrogen (Eggenstein)
Magermilchpulver	Heirler (Radolfzell)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
MTT	Sigma-Aldrich (Steinheim)
NaBH ₄	Merck (Darmstadt)
Na ₂ B ₄ O ₇	Merck (Darmstadt)
NaCl	Merck (Darmstadt)
NH ₄ OH (Ammonik)	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
NaOH	Merck (Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt)
NH ₄ HCO ₃	Merck (Darmstadt)
NaF	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumpyruvat	Gibco/Invitrogen (Eggenstein)
NP-40	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Eggenstein)
Pferdeserum	Invitrogen (Eggenstein)
Phenol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Piperidin	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI 1640	Invitrogen (Eggenstein)
TBTU	IRIS Biotech (Marktredwitz)
Thioanisol (> 99 %)	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
Thioflavin T	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TFA (HPLC, > 99,95 %)	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)

TFA (Peptidsynthese, > 99 %)	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Eggenstein)
Tween 20	Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.2 Peptide

2.2.1 Kommerziell erworbene und in der Arbeitsgruppe synthetisierte Peptide

Peptid	Hersteller/Lieferant
humanes IAPP (1-37) (hIAPP)	PSL GmbH (Heidelberg) und laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
Ratten IAPP (1-37) (rIAPP)	Calbiochem/Merck (Darmstadt) und laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
IAPP-GI	laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
IAPP-FA	laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
IAPP-AL	laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
IAPP-IL	laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
NFGAIL-GI	laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
A β (1-40)	Bachem (Weil am Rhein) und laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
DAC-A β (1-40)	Calbiochem/Merck (Darmstadt) und laboreigene Synthese (Kapitel 2.2.2)
A β (1-42)	Bachem (Weil am Rhein)
Insulin, isoliert aus dem Pankreas von Rindern	Sigma-Aldrich (Steinheim)
humanes Parathyroidhormon (1-34) (PTH)	Bachem (Weil am Rhein)

Bei allen Peptiden, außer Insulin, handelt es sich um synthetisch hergestellte Peptide. Das von der PSL GmbH erworbene IAPP war noch am Träger gekoppelt. Die Abspaltung des Peptids von der Festphase und die chromatographische Aufreinigung sind in den Kapiteln 2.2.2 und 2.2.5 beschrieben.

2.2.2 Peptidsynthese

Die Synthese der Peptide IAPP-FA, IAPP-GI, IAPP-AL, IAPP-IL, hIAPP, rIAPP und A β (1-40) wurden von Erika Andreetto, Heidi Vasen und Athanasios Kazantzis mittels festphasen-peptidsynthetischen Methoden (solid phase peptide synthesis, SPPS) durchgeführt [95].

Das Prinzip der SPPS besteht darin, eine Aminosäure (AS) über ihre Carboxygruppe an ein unlösliches, leicht filtrierbares Polymer zu knüpfen, und dann vom C-Terminus her die Peptidkette schrittweise aufzubauen [224]. Durch die Immobilisierung können die verwendeten Reagenzien sehr schnell ausgewaschen werden. Über einen so genannten Anker wird die erste N $^{\alpha}$ -geschützte Aminosäure mit der reaktiven Gruppe am Kunstharz-Träger, der aus Polystyrol besteht, gekoppelt. Von der am Trägerpartikel kovalent verankerten Aminosäure wird die N $^{\alpha}$ -Aminoschutzgruppe selektiv entfernt und das resultierende Aminoacyl-Polymer mit der nächsten N $^{\alpha}$ -geschützten Aminosäure umgesetzt. In Abhängigkeit von der Kettenlänge des aufzubauenden Peptids führt die entsprechende Wiederholung der letzten zwei Reaktionsschritte zum vollgeschützten, trägergebundenen Peptid. Zuletzt wird durch ein Abspaltungsreagenz die kovalente Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure der aufgebauten Peptidkette und der Ankergruppierung des polymeren Trägers gelöst und die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten abgespalten. Der unlösliche Träger kann durch Filtration von dem in Lösung vorliegenden Peptid abgetrennt werden.

Für die Synthese wurde hier als Festphasenmatrix Rink-Amid-MBHA-Harz (mit Methylbenzhydrylamid-Gruppen (MBHA) versehenes Polystyrolharz, Novabiochem/Merck, Darmstadt) verwendet. Der säurelabile Rink-Linker [225] war bereits am Träger gekoppelt. Das Peptid A β (1-40) wurde an einem Träger mit säurelabilen Wang-Linker synthetisiert (Wang-Harz, Bachem) [226].

Als Lösungsmittel für sämtliche Reaktionsschritte – AS-Kopplung, Abspaltung der N $^{\alpha}$ -geschützten AS und Waschschrte – diente N,N-Dimethyl-formamid (DMF). Die verwendeten AS waren N $^{\alpha}$ -terminal mit der Schutzgruppe Fluorenyl-methyl-oxy-carbonyl (Fmoc) blockiert, zusätzlich waren die reaktiven Gruppen der Seitenketten mit entsprechenden Verbindungen geschützt. Um die erste AS über eine Amidbindung C-terminal an den Träger zu koppeln, wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe des Linkers mit 25 % Piperidin abgespalten. Nach den Waschschrten mit DMF wurde die Carboxygruppe der ersten N $^{\alpha}$ -Fmoc-geschützten AS durch die Zugabe des Kopplungsreagenz 2-(1 H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyl-Uronium Tetrafluorborat (TBTU) und

N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) aktiviert. Nach Ausbildung der Peptidbindung zwischen Linker und AS wurde wieder mit DMF gewaschen. Um die zweite N^α-Fmoc-geschützte AS zu koppeln, wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der ersten gebundenen AS mit 25 % Piperidin abgespalten. Danach erfolgte, über die Bildung des reaktiven Esters durch TBTU und DIEA, die Aktivierung der zweiten AS. Nach Anbindung der zweiten AS wurden wieder Waschschrte durchgeführt und ein neuer Zyklus zur Kopplung der nächsten AS gestartet. Diese Schritte wurden bis zum Erreichen der gewünschten Kettenlänge für jede AS wiederholt. Zur Vermeidung von Peptiden mit Deletionsstellen wurde nach jeder AS-Kopplung ein Blockierungsschritt durch Acetylierung aller noch freien Amino-Gruppen durchgeführt.

Für die Abspaltung der Oligopeptidkette vom Träger und Trennung aller Schutzgruppen wurde eine so genannte Reagenz K-Lösung verwendet, die aus 89 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA), 6,7 % (w/v) Phenol, 4,4 % (v/v) Thioanisol, 2,2 % (v/v) Ethandithiol und 4,4 % (v/v) Wasser besteht. Der Zusatz von Phenol, Thioanisol und EDT dient zum Schutz der reaktiven Gruppen der Peptidylreste vor unerwünschten Veränderungen durch die Säurebehandlung. Nach der Peptid-Harz-Abspaltung wurde das Harz abfiltriert, mehrfach mit TFA gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Anschließend wurde das Produkt aus dem eingengten Filtrat mit Diethylether gefällt und nach zwei Waschschrten mit Ether getrocknet (2.2.6). Eine weitere Aufreinigung der Peptide erfolgte mittels Umkehrphasen- (reversed phase) Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC, siehe Kapitel 2.2.5). Die Molekülmasse der synthetisierten Peptide wurde massenspektroskopisch überprüft (Kapitel 2.2.5). Die gereinigten Peptide wurden lyophilisiert (2.2.6) und bis zur weiteren experimentellen Verwendung bei -20°C gelagert.

Um die Ausbildung der Schwefelbrücke (Cys² zu Cys⁷) bei IAPP und seinen Analoga zu ermöglichen, wurden die Rohprodukte der Peptide IAPP-FA, IAPP-AL, und IAPP-IL (1 mg/ml) in einer 0,1 M NH₄HCO₃-Lösung, die 6 M Guanidinium beinhaltet, gelöst und unter Sauerstoffzufuhr oxidiert. Für die Oxidation von IAPP wurde der 6 M Guanidinium/0,1 M NH₄HCO₃-Lösung 10 % DMSO zugesetzt. IAPP-GI und rIAPP wurden dagegen in einer 3 M Guanidinium/0,1 M NH₄HCO₃-Lösung oxidiert. Der Verlauf des Oxidationsprozesses wurde mittels HPLC überprüft (siehe Kapitel 2.2.5).

2.2.3 Fluoreszenzmarkierung von Peptiden

a) Markierung mit Fluorescein

Zur Charakterisierung der Peptid-Wechselwirkung mittels Fluoreszenzspektroskopie (Kapitel 2.5.2), wurden die Peptide IAPP-FA, IAPP-GI, IAPP-AL, IAPP-IL, hIAPP und rIAPP N^α-aminoterminal mit der Fluoreszenzsonde Fluorescein markiert. Als Lösungsmittel für sämtliche Reaktionsschritte – Fmoc-Abspaltung der N^α-geschützten AS, Fluorescein-Kopplung und Waschschrte – diente DMF. Um das Fluorescein an die Polypeptidkette zu

koppeln, wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der N-terminalen AS mit 25 % Piperidin abgespalten. Nach den Waschschritten mit DMF wurde das Fluorescein (3-fach molarer Überschuss in Bezug auf die Harzbeladung), das Kopplungsreagenz TBTU (3-facher Überschuss) und DIEA (4,5-facher Überschuss) zugegeben. Nach Ausbildung der kovalenten Amidbindung zwischen der N-terminalen AS und dem Fluorescein, wurde wieder mit DMF gewaschen. Die Fluorescein-Kopplung wurde insgesamt 2-mal (3 h und 24 h) durchgeführt. Die Abspaltung, Aufreinigung und Charakterisierung der Fluorescein-markierten Peptide sind in Kapitel 2.2.2 und 2.2.5 beschrieben.

b) Markierung mit 7-Diethylaminocoumarin-3-Carbonsäure (DAC)

Um die A β (1-40)-Selbstassoziation und die Interaktion mit IAPP bzw. IAPP-GI zu messen, wurde der freie N-Terminus von synthetisiertem A β (1-40), welches noch am Wang-Harz gekoppelt war, mit DAC markiert. Als Lösungsmittel für sämtliche Reaktionsschritte wurde DMF verwendet. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe der N-terminalen AS mit 25 % Piperidin abgespalten. Nach den Waschschritten mit DMF wurde DAC (5-fach molarer Überschuss in Bezug auf die Harzbeladung) mit dem Kopplungsreagenz TBTU (5-facher Überschuss) und DIEA (7,5-facher Überschuss) zugegeben. Nach der Aktivierung der Carboxygruppe des Fluorophors durch TBTU und DIEA wurde DAC an der freien NH₂-Gruppe der N-terminalen AS gekoppelt. Nach Ausbildung der kovalenten Amidbindung wurde wieder mit DMF gewaschen. Die DAC-Kopplung wurde insgesamt 2-mal für je 2 h durchgeführt. Die Abspaltung, Aufreinigung und Charakterisierung des DAC-markierten Peptids sind in Kapitel 2.2.2 und 2.2.5 beschrieben.

2.2.4 Biotinylierung von IAPP-GI

Die Wechselwirkung zwischen A β (1-40) bzw. A β (1-42) mit IAPP-GI wurde zusätzlich mit dem Biotin-pull-down-Assay untersucht (siehe 2.6.3). Für diese Analyse wurde IAPP-GI mit Biotin markiert. Auch hier wurde für alle Reaktionsschritte DMF als Lösungsmittel verwendet. Zuerst erfolgte die Abspaltung (25 % Piperidin) der Fmoc-Schutzgruppe der N-terminalen AS des IAPP-GI, welches noch an Rink-Amid-Harz gebunden war. Nach den Waschschritten mit DMF wurde vor der Biotinylierung Fmoc-geschützte 6-Aminohexansäure (Fmoc-Aca-OH, 3-fach molarer Überschuss in Bezug auf die Harzbeladung) als Linker unter Verwendung von TBTU (3-facher Überschuss) und DIEA (4,5-facher Überschuss) gekoppelt. Dieser Reaktionsschritt wurde 2-mal für je 45 min durchgeführt. Nach den Waschschritten wurde als nächstes die Fmoc-Schutzgruppe der 6-Aminohexansäure mit 25 % Piperidin gespalten. Die Kopplung des Biotins (3-facher Überschuss) erfolgte durch die Zugabe von TBTU (3-facher Überschuss) und DIEA (4,5-facher Überschuss). Auch dieser Reaktionsschritt wurde 2-mal für je 45 min durchgeführt. Die Abspaltung, Aufreinigung und Charakterisierung des Biotin-markierten IAPP-GI sind in Kapitel 2.2.2 und 2.2.5 beschrieben.

2.2.5 Aufreinigung und Charakterisierung der Peptide

Die Aufreinigung der Rohprodukte aus der Peptidsynthese wurde über Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie an einer Jasco HPLC-Anlage (Jasco, Gross-Umstadt) im semipräparativen Maßstab durchgeführt. Bei chromatographischen Methoden läuft das zu trennende Substanzgemisch als mobile Phase über eine stationäre Phase. Die unterschiedlichen Wechselwirkungen der Moleküle mit dieser stationären Phase bewirken unterschiedliche Wandergeschwindigkeiten und damit die Auftrennung der Moleküle.

Zur Aufreinigung wurden die Rohprodukte (1 mg/ml) je nach Peptid in 3 M oder 6 M Guanidinium/0,1 M NH_4HCO_3 pH 8 gelöst. Davon wurde pro Lauf 1 ml (1 mg) injiziert und mit einem ansteigenden Acetonitril-Gradienten bei einer Flußrate von 2 ml/min aufgereinigt. Abhängig von dem aufzureinigenden Peptid wurde ein langsames oder schnelles Laufprogramm (Tabelle 2.1) durchgeführt. Im nachfolgenden ist der Verlauf des Gradienten beider Programme aufgelistet. Alle Laufmittel wurden zuerst im Ultraschallbad entgast.

Puffer A

0,058 % Trifluoressigsäure

Puffer B

90 % Acetonitril

0,05 % Trifluoressigsäure

Tabelle 2.1: HPLC-Programme zur Aufreinigung der Peptide

Langsames Programm			Schnelles Programm		
Zeit (min)	Puffer A	Puffer B	Zeit (min)	Puffer A	Puffer B
0	70 %	30 %	1	90 %	10 %
7	70 %	30 %	31	10 %	90 %
37	40 %	60 %			

Zur Aufreinigung wurde eine Nucleosil C18-Säule der Firma Grom Alltech (Rottenburg-Hailfingen) verwendet. Die Peptide wurden durch Messung der Absorption bei 214 nm detektiert, abgetrennt, lyophilisiert und bis zur experimentellen Verwendung bei -20 °C gelagert.

Molekulargewichtsbestimmungen der gereinigten Peptide mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie wurden durch R. Fischer (Zellbiologie, Universität Tübingen), D. Bächle, H. Kalbacher (PANATecs GmbH) und S. Stevanovic (Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen) durchgeführt.

2.2.6 Lyophilisation von Proteinlösungen

Das Lyophilisieren der Peptide wurde in dieser Arbeit jeweils im Anschluss an die RP-HPLC durchgeführt, um Acetonitril und TFA abzutrennen und die Peptide in einem festen Zustand als Pulver lagern zu können. Die Fraktionen der RP-HPLC wurden auf Trockeneis eingefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ-LOC-1m Alpha 1-4, Christ, Stuttgart) lyophilisiert. Auch die kommerziell erhaltenen Peptide wurden nach dem Aliquotieren und Einfrieren lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Für das Aliquotieren wurden die Peptide 1 mg/ml in 80 % HPLC-Puffer B (72 % (v/v) ACN/0,04% (v/v) TFA-Wassergemisch) gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Sarsted, Nümbrecht) auf 20-100 µl Aliquots aufgeteilt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung der Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilwerkbänken (Heraeus (Hanau) und Kojair (Düsseldorf)), durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Medien, Lösungen und Arbeitsmaterialien verwendet. Die Zellkultivierung erfolgte in befeuchteten Inkubations-schränken bei 37 °C und 5 % CO₂ (Sanyo, München).

Die Phäochromozytom-Zellen (PC-12), eine Tumorzelllinie aus dem Nebennierenmark von Ratten [227], wurde von Dr. R. Lilischkis, Universitätsklinikum der RWTH Aachen, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum, 5 % fetalem Kälberserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin (25 U/ml/25 µg/ml). Die adhärenz wachsenden Zellen wurden auf poly-L-Lysin beschichtete 75 cm² Kulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät. Zum Beschichten wurden die Zellkulturplatten für 2 Stunden mit 4 ml einer poly-L-Lysin-Lösung (1 mg/ml in 150 mM Na₂B₄O₇-Puffer pH 8,4) inkubiert und anschließend viermal mit 10 ml bidest. Wasser gewaschen. Die PC-12 Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Das Ablösen der Zellen wurde mit 0,5 g/l Trypsin/0,2 g/l EDTA (5 ml) durchgeführt. Die Aussaatdichte für die Vermehrung betrug 5×10^5 Zellen pro ml.

Die pankreatischen β-Zellen RIN5fm, welche aus einem Ratten-Insulinom (RIN) stammen [228], wurde von T. E. Rucinsky des Washington University Tissue Culture Support Center zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der adhärenz wachsenden Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mg/ml Glucose, 1 mM Natriumpyruvat und Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml). Die RIN-Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro ml

ausgesät und nach dem Erreichen einer 90 %igen Konfluenz unter Verwendung von 0,5 g/l Trypsin/0,2 g/l EDTA (5 ml) gesplittet. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

Die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 [229] wurde von B. Lüscher, Universitätsklinikum der RWTH Aachen, zur Verfügung gestellt. Die Vermehrung erfolgte in 75 cm² Kulturfラスchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) unter Verwendung von Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml) kultiviert. Die adhären wachsenden Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % unter Verwendung von 0,5 g/l Trypsin/0,2 g/l EDTA (5 ml) im Verhältnis 1:5 passagiert.

2.3.2 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Nach dem Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturfラスche (siehe 2.3.1) wurden die Zellen bei 1250 rpm für 5 min abzentrifugiert (HERMLE Z 400 K, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen) und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in 8 Quadraten unter einem Olympus CK40 Durchlichtmikroskop (Olympus Co., Hamburg, Deutschland) gezählt. Den Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 10⁴ ergibt die Zellzahl pro ml.

2.3.3 Durchführung der Zelltoxizitäts-Assay

a) Aβ(1-40)-vermittelter Zelltod an PC-12 Zellen

24 Stunden vor Zugabe der Peptide wurden PC-12 Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro ml in poly-L-Lysin-beschichtete 96-Well Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausplattiert und im Inkubationsschrank kultiviert. Synthetisch hergestelltes Aβ(1-40) wurde in 80 % HPLC-Puffer B (1 mg/ml) gelöst, aliquotiert und lyophilisiert (2.2.6). Trocken es Aβ(1-40) wurde zunächst in Hexafluorisopropanol (HFIP) gelöst. Zur Herstellung der 1/1-Aβ(1-40)/Peptid-Inkubationen wurden die Inhibitoren (aus HFIP-Stammlösungen) einzeln mit Aβ(1-40) gemischt. Nach einer 10-minütigen Lagerung der Lösungen auf Eis wurde das HFIP mit Stickstoff verdampft. Aβ(1-40) allein (10 µM) und die Mischungen wurden in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4, 150 mM NaCl, 1,1 % HFIP gelöst und 4 Tage bei 25 °C vorinkubiert. Danach erfolgte die Verdünnung der Peptid- und Pufferlösung im Zellkulturmedium, die Zugabe zu den PC-12 Zellen (10 µl in 100 µl/Well) und eine weitere 20-stündige Inkubation im Zellkulturbrutschrank (37 °C, 5 % CO₂). Der Effekt von Aβ(1-40) auf die Zellen wurde in einem Konzentrations-bereich von 1 nM bis 0,75 µM untersucht. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch die Quantifizierung des MTT-Reduktionsvermögens der Zellen (siehe Kapitel 2.4.1).

b) Induktion von Apoptose durch A β (1-40) in PC-12 Zellen

Wie bereits oben beschrieben wurden auch hier die PC-12 Zellen 24 h vor Zugabe der Peptide mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro ml in poly-L-Lysin-beschichtete 12-Well Zellkulturplatten ausplattiert und im Inkubationsschrank kultiviert. Die Arbeitsschritte zur Herstellung der A β (1-40)-Lösung und A β (1-40)/IAPP-GI-Mischung (1/1) sind bereits im Kapitel 2.3.3 a) beschrieben. Hier betrug die A β (1-40)-Konzentration 100 μ M und die Lösungen wurden in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4, 50 mM NaCl, 2,2 % HFIP 4 Tage bei 25 °C inkubiert. Die Peptidlösungen und der Puffer allein wurden zu den Zellen pipettiert (A β (1-40)-Endkonzentration 1 μ M, 75 μ l in 750 μ l/Well) und nach einer 20-stündiger Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) wurde die Apoptoserate mittels ELISA gemessen (siehe Kapitel 2.4.2) [269].

c) Zytotoxizität der A β (1-42)-Spezies gemessen an PC-12 Zellen

PC-12 Zellen (1×10^5 Zellen/ml) wurden in poly-L-Lysin-beschichtete 96-Well Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausplattiert und 24 h im Inkubationsschrank kultiviert. Synthetisch hergestelltes A β (1-42) wurde in 80 % HPLC-Puffer B (1 mg/ml) gelöst, aliquotiert und lyophilisiert (2.2.6). Danach wurden die Aliquots in einem 35 % (v/v) ACN/ 0,1 % (v/v) TFA-Wassergemisch (1 mg/ml) gelöst, für eine Stunde bei 25 °C inkubiert und wieder lyophilisiert (2.2.6). A β (1-42) wurde in Medium gelöst und zu trockenem IAPP-GI pipettiert (1/1- und 1/10-Mischungen). Die A β (1-42)-Konzentrationen waren in einem Bereich von 10 pM bis 100 nM. Die Lösungen wurden bei 25 °C gelagert. Nach 20 h wurde das Medium aus jedem Well abgesaugt und die gealterten Lösungen und Medium allein zu den PC-12 Zellen dazugegeben. Nach weiteren 24 h im Zellkulturbrutschrank wurde die Zellvitalität mithilfe des MTT-Reduktions-Assays gemessen (siehe Kapitel 2.4.1).

d) Insulin-vermittelter Zelltod in RIN-Zellen

RIN-Zellen wurden 24 h vor Zugabe der Peptide mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro ml in 96-Well Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausplattiert und im Inkubationsschrank kultiviert. Insulin wurde in 80 % HPLC-Puffer B (1 mg/ml) gelöst, aliquotiert und lyophilisiert (2.2.6). Zuerst wurde eine 200 μ M Insulinstammlösung in Wasser pH 2 bei RT hergestellt und diese weiter im gleichen Lösungsmittel auf 20 μ M verdünnt. Zur Herstellung der Wasser pH 2-Lösung wurde Wasser mit einer 1,5 molaren HCl auf einen pH-Wert von 2 titriert. Für die Insulin/Peptid-Mischungen wurde 20 μ M Insulin zu trockenem Peptid dazugegeben und die Lösungen bei 60 °C im Trockenschrank (Heraeus Function Line Type 6, Hanau) gelagert. Die Inkubationszeiten betrugen zwischen 24 h und 7 Tagen. Danach wurde das Lösungsmittel, Insulin, die Mischungen und die Peptide allein mit Zellkultur-medium versetzt, zu den RIN-Zellen pipettiert (10 μ l in 100 μ l/Well) und für weitere 24 h im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Der Effekt von Insulin auf die Zellen wurde in einem

Endkonzentrationsbereich von 100 pM bis 1 μ M untersucht. Die Zellvitalität wurde anhand des MTT-Reduktionsvermögens der Zellen gemessen (siehe Kapitel 2.4.1).

e) Induktion des apoptotischen Zelltods an RIN-Zellen durch toxische Insulin-Spezies

Die Probenaufarbeitung von 20 μ M Insulin allein und der Insulin/IAPP-GI-Mischung (1/10) ist bereits unter d) beschrieben. Die Peptidlösungen und Wasser pH 2 allein wurden für 72 h bei 60 °C gelagert. 24 h vor Zugabe der Inkubationen wurden die RIN-Zellen (5×10^5 Zellen/ml) in 12-Well Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausplattiert und im Inkubationsschrank kultiviert. Die Lösungen wurden mit Medium verdünnt (Insulin-Endkonzentration 1 μ M) und zu den Zellen pipettiert (75 μ l in 750 μ l/Well). Nach einer weiteren Inkubation von 20 Stunden im Zellkulturbrutschrank wurde die Apoptoserate mittels ELISA gemessen (siehe Kapitel 2.4.2) [278].

2.3.4 Insulin vermittelte Signaltransduktion

In jede Zellkulturschale (10 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen) wurden 5×10^6 MDA-MB-468 Zellen ausgesät und im Inkubationsschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium gegen FCS-freies Medium ausgetauscht und die Zellen wieder über Nacht in den Brutschrank gelegt. Aus 80 % HPLC-Puffer B lyophilisiertes Insulin wurde in Wasser pH 2 auf 200 μ M gelöst und weiter auf 20 μ M verdünnt. Ein Teil davon wurde zu trockenem IAPP-GI pipettiert (Insulin/IAPP-GI-Mischung 1/10). Die frisch hergestellten Peptidlösungen wurden mit Zellkulturmedium auf 2 μ M verdünnt und für 5 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Aus jeder Zellkulturschale wurde 5 ml Medium abgesaugt und die entsprechende vorinkubierte Peptidlösung (5 ml) dazupipettiert (finale Insulinkonzentration 1 μ M). Zur Stimulierung der Zellen wurden die Schalen für 3 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2-mal mit 10 ml kaltem 1 $\times$ PBS-Puffer (Tabelle 2.2) gewaschen. Nach kurzem Schwenken der Zellkulturschalen bei 4 °C wurde der PBS-Puffer verworfen. Um die Zellen zu lysieren wurde in jede Zellkulturschale 1 ml Lysepuffer (Tabelle 2.3) pipettiert und die Schalen für 20 min bei 4°C geschwenkt. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipettenspitze abgesaugt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um die Zellwandbruchstücke von den löslichen Bestandteilen zu trennen, wurden die Lysate bei 4 °C und 14000 g für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig mit einer Pipettenspitze entnommen und in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese Überstände wurden verwendet, um den phosphorylierten Insulinrezeptor, Akt und phosphoAkt zu detektiert (siehe Kapitel 2.6.5, 2.6.7 b) und d)).

Tabelle 2.2: Bestandteile des PBS-Puffers pH 7,4 (1×).

Nach der Herstellung des Puffers wurde der pH-Wert mittels einer 2 M wässrigen HCl-Lösung auf 7,4 eingestellt.

PBS-Puffer pH 7,4 (1×)	Konzentration
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ HPO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Lysepuffers

Lysepuffer	Konzentration/ Menge
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
NaF	40 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
NP-40	1 %

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Zellvitalität durch MTT-Reduktion

Die Lebensfähigkeit von Zellen nach der Inkubation mit toxischen Peptidkonformationen und -aggregaten wurde anhand des kolorimetrischen MTT-Assays quantifiziert. Dieses Testsystem basiert auf der Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) durch die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zum blau-violetten Formazan [230]. Die Menge des gebildeten Farbstoffes wird photometrisch bestimmt.

PC-12 und RIN-Zellen wurden in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät und mit den einzelnen Peptiden, wie unter 2.3.3 beschrieben, behandelt. Nach der Inkubationszeit im Zellkulturbrutschrank wurde in jedes Well zu 100 µl Medium 25 µl einer MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS-Puffer pH 7,4; MTT von Sigma-Aldrich, Steinheim) pipettiert und weitere 2 Stunden mit den RIN-Zellen bzw. 4 h mit den PC-12 Zellen inkubiert. Um die Formazan-kristalle aus den vitalen Zellen in Lösung zu bringen, wurden die PC-12 Zellen mit 90 µl SDS-Lysepuffer (10 % SDS in 20 mM HCl) behandelt. Die Zellkulturplatte wurde über Nacht im Dunkeln bei 25 °C leicht geschüttelt. Bei den RIN-Zellen wurde zunächst das Medium und die MTT-Lösung aus jedem Well abgesaugt. Zur Lyse der Zellen wurden 100 µl einer Isopropanol/0,04 N HCl-Mischung pipettiert und für 10 min bei 25 °C geschüttelt. Die Absorption wurde bei 570 nm am Mikrotiterplattenphotometer (Bio-Rad, München)

gemessen. Jeweils drei gleich behandelte Wells wurden zu einem Wert gemittelt. Die gemessene Absorption bei Zellen die vor der Zugabe der MTT-Lösung mit 1 % Triton (TX-100) lysiert wurden, galt als Blindwert und wurde von den anderen Werten abgezogen. Den unbehandelten Zellen wurde eine MTT-Reduktion von 100 % zugeschrieben. Für die Auswertung wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{MTT Reduktion [\%]} = \frac{A - \bar{A}_{\text{Lyse}}}{\bar{A}_K - \bar{A}_{\text{Lyse}}} \times 100 \quad \text{Gl. 1}$$

A : gemessene Adsorption im Well

$\bar{A}_{\text{Lyse}}$: Mittelwert der Adsorption aus 3 Wells durch Triton lysierter Zellen

$\bar{A}_K$: Mittelwert der Adsorption aus 3 Wells der Kontrollzellen (unbehandelt)

2.4.2 Messung der zellulären Apoptoserate mittels ELISA

Die im Nachfolgenden beschriebenen Experimente wurden von Marianna Tatarek-Nossol durchgeführt [269, 278]. Zur Detektion des A β (1-40)-induzierten apoptotischen Zelltods an PC-12 Zellen wurde der kommerziell erhältliche Cell Death Detection ELISA-Kit von Roche (Mannheim) verwendet. Die Insulin-induzierte Apoptoserate wurde an RIN-Zellen gemessen. Nach Behandlung der Zellen mit den Peptiden (siehe Kapitel 2.3.3 Absatz b) und e)) und der Zelllyse wurde in der zytoplasmatischen Fraktion die im Verlauf der Apoptose zunehmende DNA-Fragmentierung durch den Nachweis der bei diesem Prozess entstehenden Mono- und Oligo-Nukleosomen gemessen. Die Nukleosomen wurden an einer mit anti-Histon-Antikörper beschichteten 96-Well Platte immobilisiert und durch einen POD-konjugierten anti-DNA-Antikörper nachgewiesen (Sandwich-ELISA). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die optische Dichte (OD) bei 405 nm wurde mit einem Wallac Victor 2 Multi-Label-Counter (PerkinElmer, Boston, USA) gemessen.

2.4.3 Thioflavin T-Assay

Die Fibrillenbildung von A β (1-40) und Insulin wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T detektiert. Thioflavin T hat die Eigenschaft an amyloide Strukturen zu binden [231]. Charakteristisch für die Fibrillen ist eine so genannte cross- β Struktur. Durch diese Struktur bilden sich parallel zur Faserachse kleine Kanäle aus, in die Thioflavin T Moleküle mit den Seitenketten der β -Faltblätter wechselwirken können (siehe Abbildung 2.1) [232]. Diese Interaktion führt zu einer Verschiebung des Absorptions- (von 342 nm auf 442 nm) und Emissionsspektrums (von 430 nm auf 482 nm) des Farbstoffs [44]. Thioflavin T allein wird bei einer Wellenlänge von 342 nm angeregt, das Maximum der Emission befindet sich bei 430 nm (siehe Abbildung 1.10). Dies ermöglicht eine quantitative Messung der Fibrillen/Thioflavin T-Komplexe in Anwesenheit von ungebundenen Farbstoffmolekülen.

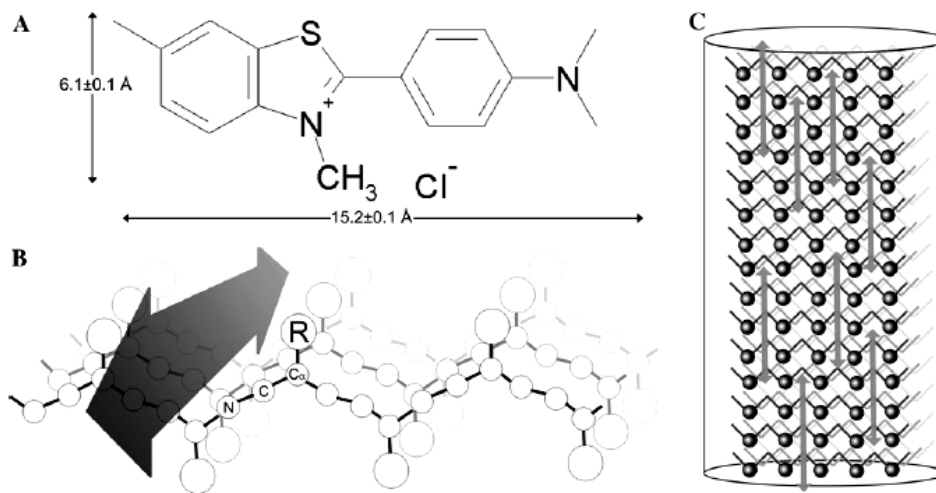


Abbildung 2.1: Bindung von Thioflavin T an β -Faltblatt-Strukturen von Peptiden.

A: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T (ThT). B: Schematische Darstellung der Anlagerung eines ThT-Moleküls an β -Faltblätter (N, C, C_{α} kennzeichnen das Rückrad einer Peptidkette, mit R sind die Aminosäureseitenketten dargestellt). C: Interkalation von mehreren ThT-Molekülen an eine fibrilläre Struktur. Quelle [232].

a) Thioflavin T-Assay zum Nachweis von A β (1-40)-Fibrillen

Der Thioflavin T-Assay wurde von Li-Mei Yan durchgeführt [269]. Synthetisch hergestelltes A β (1-40) wurde in 80 % HPLC-Puffer B (1 mg/ml) gelöst, aliquotiert und lyophilisiert (2.2.6). Trockenes A β (1-40) wurde zunächst in HFIP gelöst. Nach einer 10-minütigen Lagerung der Lösung auf Eis wurde das HFIP mit Stickstoff verdampft. A β (1-40) wurde auf 16,5 μ M in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst und bei 25 °C inkubiert. Bei $t = 0$, $t = 24$ und in einem Zeitraum von 144-288 h wurden 20 μ l der A β (1-40)-Lösung entnommen und zu 180 μ l Thioflavin T-Lösung (5 μ M in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,4), die in einer 96-Well Platte (Nunc 96 MicroWell™ Plate, Black, Nunc, Langenselbold) vorgelegt wurden, pipettiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm mit einem Wallac Victor 2 Multi-Label-Counter (PerkinElmer, Boston, USA).

b) Thioflavin T-Assay zur Untersuchung der Fibrillognese von Insulin

Für die Fibrillenbildung wurden lyophilisierte Insulinliquots (aus 80 % HPLC-Puffer B) auf 10 μ M in Wasser pH 2 gelöst. Um den inhibitorischen Effekt von IAPP, seinen Analoga und des Parathyroidhormons auf die Insulin-Fibrillognese zu untersuchen, wurde ein Teil der 10 μ M Insulinlösung zu trockenem Peptid (5-facher Überschuss) pipettiert. Der Einfluss von IAPP-GI wurde anhand einer Titrationsreihe untersucht (IAPP-GI 10 μ M bis 200 μ M). Zu allen Proben wurde anschließend Thioflavin T (Sigma-Aldrich, Steinheim) aus einer 1 mM Stammlösung (in Wasser pH 2) zugegeben. Die finale Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes betrug 20 μ M. Von allen Proben wurden 250 μ l entnommen und in eine 96-Well

Platte pipettiert (Nunc 96 MicroWell™ Plate, Black, Nunc, Langenselbold). Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Absorptionswellenlänge von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm mit einem Wallac Victor 2 Multi-Label-Counter (PerkinElmer, Boston, USA). Danach wurde die Platte zum Schutz vor Verdampfung mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt und bei 60 °C für 14 Tage inkubiert. Alle 24 Stunden wurde die Platte aus dem Inkubator herausgenommen, auf Eis für 5 min abgekühlt und die Fluoreszenz gemessen. Das Protokoll des Gerätes beinhaltet vor jeder Messung ein Schütteln der Platte für 5 Sekunden. Danach wurde die Platte wieder mit der Folie abgedichtet und weiter bei 60 °C gelagert.

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 UV/Vis-Spektroskopie

Eine Möglichkeit zur Bestimmung des Peptidgehalts in einer Lösung bietet die Absorptionsmessung. Ein wesentlicher Vorteil der spektroskopischen Konzentrationsbestimmung ist, dass die Proben nach der Messung für weitere Untersuchungen verwendbar bleiben. Durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes wird die Konzentration des Peptids über seine Extinktion (Absorption) berechnet.

$$E = \epsilon \times c \times d \quad \text{Gl. 2}$$

E: gemessene Extinktion

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

c: molare Konzentration der Probe

d: Küvettschichtdicke

Peptide beinhalten mehrere Molekülbestandteile die Licht im ultravioletten Bereich absorbieren können. Zu diesen, auch als Chromophore bezeichneten Gruppen, gehören die Peptidbindungen, Disulfide und die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Die Absorption von Peptidbindungen liegt im nahen UV-Bereich bei 190 nm, die der aromatischen Aminosäurereste und Disulfide in einem Bereich von 260 bis 280 nm.

In dieser Arbeit wurde anhand der UV-Spektroskopie die Konzentration der Stammlösungen von IAPP und seiner Analoga in HFIP bestimmt. Diese Peptide beinhalten in ihrer Sequenz einen aromatischen Rest der Aminosäure Tyrosin und eine Disulfidbrücke. Unter der Berücksichtigung beider Chromophore wurde bei einer Wellenlänge von 275 nm der Extinktionskoeffizient anhand folgender Gleichung bestimmt [234, 235]:

$$\epsilon_{275} = (nY \times 1490) + (nC - S - S - C \times 125) = 1615 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}] \quad \text{Gl. 3}$$

ϵ_{275} : molarer Extinktionskoeffizient

nY: Anzahl der Tyrosin, hier n = 1

nC-S-S-C: Anzahl der Disulfide, hier n = 1

Die Konzentration der mit Fluorescein und DAC markierten Peptide wurde anhand der Absorption der Fluorophore bestimmt. Da die Absorption dieser Moleküle vom Lösungsmittel abhängig ist, wurden die Absorptionsspektren von Fluorescein und DAC im HFIP bei bekannter Konzentration aufgenommen und die Extinktionskoeffizienten unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt. Bei Fluorescein wurde eine maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 432 nm gemessen, bei DAC wurde das Maximum bei 445 nm erreicht. Es wurden folgende Extinktionskoeffizienten berechnet:

Fluorescein $\epsilon_{432} = 22770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

DAC $\epsilon_{445} = 75940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Die HFIP-Lösungen der RP-HPLC-gereinigten Peptide wurden zuerst filtriert (Millex-FG 0,2 µm Filter, hydrophobes PTFE, Millipore, Schwalbach). Die Messungen wurden an einem Cary Bio1 UV-Vis Spektrometer der Firma Varian (Darmstadt) durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde bei jeder Messung subtrahiert. Die Schichtdicke der Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) betrug 1 cm.

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenzspektroskopie werden Moleküle photochemisch angeregt. Der energetische Grundzustand kann auf unterschiedliche Weise wieder erreicht werden. Einer der Möglichkeiten ist die strahlungslose Relaxation, bei der die Energiedifferenz in Form von Schwingungsenergie, letztlich als Wärme, abgegeben wird. Wird das eingestrahlte Licht nach der Absorption teilweise als Licht niedrigerer Energie wieder abgestrahlt spricht man von einer Fluoreszenzemission [236]. Zusätzlich kann eine Fluoreszenzlöschung, die auch als Quenching bezeichnet wird, auftreten. In diesem Fall wird die Energie von einem angeregten Molekül auf benachbarte Moleküle übertragen, der angeregte Zustand wird dadurch strahlungslos deaktiviert.

Bei Fluoreszenzuntersuchungen an Biomolekülen kann die Fluoreszenz von direkt am Molekül vorhandenen Gruppen benutzt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, die zu untersuchenden Moleküle mit fluoreszierenden Gruppen (Fluorophore) zu markieren. Im ersten Fall bezeichnet man den Prozess als intrinsische, im zweiten Fall als extrinsische Fluoreszenz und die dabei verwendeten Moleküle als Fluoreszenz-Sonden.

Fluoreszenztitration

Die Fluoreszenzspektroskopie kann zur Charakterisierung der Wechselwirkung von Biomolekülen genutzt werden. In dieser Arbeit wurde anhand von Fluoreszenztitrationen die Selbstassoziation von IAPP, seinen Analoga und Ratten-IAPP gemessen. Durch diese Methode wurde auch die Affinität zwischen den amyloiden Peptiden (IAPP, A β (1-40), A β (1-42), Insulin) und den Inhibitoren bestimmt, sowie die Stabilität der A β (1-40)/IAPP- und A β (1-40)/IAPP-GI-Heterokomplexe untersucht.

Bei dieser Messmethode wurde einer der Interaktionspartner mit einem externen Fluorophor markiert. Man machte sich hier zunutze, dass sich bei der Ausbildung des Peptid-Peptid-Komplexes die Fluoreszenzemission des Fluorophor-markierten Peptids veränderte. Die gemessenen Fluoreszenzemissionen oder Fluoreszenzänderungen (ΔF) wurden gegen die Konzentration des Liganden (logarithmische Darstellung) aufgetragen. Bei Bindungen, die eine 100-fach niedrigeren Konzentration des Fluorophor-markierten Peptids als die der Dissoziationskonstanten (K_D) aufwiesen, wurde die Annahme getroffen, dass die Konzentration an zugegebenen Ligand annähernd gleich mit der Konzentration an freiem Ligand war [237]. Die nichtlineare Kurvenanpassung und die Berechnung der Dissoziationskonstanten K_D erfolgten mit der GraphPad Prism Software (San Diego, USA) unter Anwendung folgender Formel:

$$F = F_0 + \frac{[(F_{\max} - F_0)]}{1 + 10^{[(\log K_D - L) \times \text{HillSlope}]}} \quad \text{Gl. 4}$$

F: gemessene Fluoreszenz

F_0 : Fluoreszenz des Fluorophor-markierten Peptids allein

$F_{\max}$: maximale Fluoreszenzintensität

$\log K_D$: Logarithmus der Dissoziationskonstante

L: Konzentration des Liganden

HillSlope: Steigung der Kurve

Für Wechselwirkungen mit sehr hoher Affinität wurde zur Kurvenanpassung und der K_D -Berechnung folgende Formel mittels der GraFit Erithacus Software (Horley, U. K.) angewendet [238]:

$$F = F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) \times \frac{\sqrt{\frac{([FP] + [L] + K_D)}{2} - \frac{([FP] + [L] + K_D)^2}{4}} - [FP] \times [L]}{[L]} \quad \text{Gl. 5}$$

F: gemessene Fluoreszenz

$F_{\min}/F_{\max}$: minimale/maximale Fluoreszenzintensität

[FP]: Konzentration des Fluorophor-markierten Peptids

[L]: Konzentration des Liganden

Die Emissionsspektren wurden an einem Spex Fluorolog 2 Fluoreszenzspektrophotometer (Horiba Jobin Yvon, München) bei einer Integrationszeit von 1 s und Schlitzbreiten von 2,5 nm (Anregung) und 3,7 nm (Emission) in Quarzküvetten mit 1 cm Länge (Hellma, Müllheim) bei Raumtemperatur - wenn nichts anderes angegeben ist - durchgeführt.

a) Titrationsen mit Fluorescein-markierten Peptiden

Die Selbstassoziation von IAPP, seinen Analoga, ratten IAPP und Interaktionen zwischen IAPP, A β (1-40), A β (1-42), Insulin mit den IAPP-Analoga wurden mittels N $^{\alpha}$ -aminoterminal Fluorescein-markierter Peptide gemessen. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm, die Fluoreszenzspektren wurden zwischen 500 und 600 nm aufgenommen. Alle Spektren wurden durch das Subtrahieren des Puffersignals korrigiert. Bei einer Wellenlänge von 522 nm (maximale Emission) wurde die Zunahme der Fluorescein-Emission bei steigender Konzentration des Bindungspartners gemessen. Die Konzentration der in HFIP gelösten Fluorescein-Peptide wurde mittels UV-Spektroskopie (siehe 2.5.1) bestimmt. Zuvor wurde der Extinktionskoeffizient anhand einer Fluorescein-Lösung bekannter Konzentration in HFIP ermittelt ($\epsilon = 22770$). Für die Titrationsen wurde 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 in die Küvetten pipettiert und aus HFIP-Stammlösungen entsprechender Konzentration das Fluorescein-Peptid und der Ligand dazugegeben. Die Menge an HFIP im Natriumphosphatpuffer betrug 1%, die Konzentration des Fluos-Peptides war 1, 5 oder 10 nM. Nach vorsichtigem Mischen wurde das Fluoreszenzspektrum der Lösung innerhalb von 2-5 Minuten aufgenommen. Die Stammlösungen der Fluorescein-markierten Peptide wurden grundsätzlich frisch angesetzt und lichtgeschützt auf Eis mit den Lösungen der Liganden während des Versuchs gelagert. Für die Bindungsstudien mit Insulin wurden Insulin-Aliquots aus H₂O, pH 2 verwendet, die kurz vor der Messung in H₂O gelöst und in die Küvette (10 μ l) zu dem Natriumphosphatpuffer dazugegeben wurden.

Zur Stabilitätsuntersuchung der Komplexe wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1% HFIP Mischungen aus Fluos-IAPP/IAPP (1/1000), Fluos-IAPP/ A β (1-40) (1/100), Fluos-IAPP-GI/ A β (1-40) (1/100) und Lösungen der Fluorescein-Peptide (1 nM) allein hergestellt. Der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals wurde innerhalb 20 h bei 25 °C oder 4 °C gemessen.

Zusätzlich wurde bei der Stabilität der Heterokomplexe der Effekt von 50- und 200-fachem Überschuss an A β (1-40) und die Zugabe von vorinkubiertem A β (1-40) (100 nM, 24 h bei 25 °C) untersucht.

b) Titrationsen mit DAC-markiertem A β (1-40)

Für die K_D -Bestimmung der A β (1-40)-Selbstassoziation und Heteroassoziation mit IAPP und IAPP-GI wurden Fluoreszenztitrationsen mit N $^{\alpha}$ -aminoterminal 7-Diethylaminocoumarin-3-Carbonyl-markiertes A β (1-40) (DAC-A β (1-40)) durchgeführt. Befindet sich das Fluorophor

DAC in einer hydrophoben Umgebung steigt seine Emission an, in einer hydrophilen Umgebung sinkt sie dagegen ab [239].

Während der Aufnahme der Fluoreszenzspektren (440 bis 550 nm) wurde mit einer Wellenlänge von 430 nm angeregt. Die aufgenommenen Spektren wurden durch Subtraktion des Puffersignals korrigiert. Bei einer Wellenlänge von 465 nm wurde die Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzemission von DAC bei steigender Konzentration des Bindungspartners gemessen. Die Konzentration von DAC-A β (1-40), gelöst in HFIP, wurde mittels UV-Spektroskopie (2.5.1) bestimmt. Hierfür wurde zunächst der Extinktionskoeffizient anhand einer DAC-A β (1-40)-Lösung bekannter Konzentration in HFIP ermittelt ($\epsilon = 75938$). Bei der Herstellung der Messlösungen wurde zuerst 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 in die Küvetten vorgelegt und danach aus HFIP-Stammlösungen entsprechender Konzentration DAC-A β (1-40) und der Ligand dazupipettiert. Die Menge an HFIP in der Messlösung betrug 1%, die Konzentration an DAC-A β (1-40) war 10 nM. Nach vorsichtigem Mischen wurde das Fluoreszenzspektrum der Lösung innerhalb von 2-5 Minuten aufgenommen. Die Stammlösungen des DAC-A β (1-40) wurden frisch angesetzt und lichtgeschützt auf Eis mit den Lösungen der Liganden während des Versuchs gelagert.

Die Stabilität der DAC-A β (1-40)/A β (1-40)-Assoziation und der DAC-A β (1-40)/IAPP- bzw. DAC-A β (1-40)/IAPP-GI-Heterokomplexe wurde in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Mischungen wurden aus DAC-A β (1-40) 10 nM und bei 100-fachem Überschuss an A β (1-40), IAPP oder IAPP-GI in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1% HFIP hergestellt. Die Fluoreszenzänderung der Lösungen wurde innerhalb 20 h bei 25 °C und 4 °C gemessen. Die Stabilität der Heterokomplexe bei 50 und 300-fachem Überschuss an IAPP und IAPP-GI wurde ebenfalls untersucht.

Die zeitabhängige Signaländerung von DAC-A β (1-40) allein wurde bei einer Konzentration von 10, 60, 120 und 360 nM in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1% HFIP gemessen. Die Stabilität des Fluorophors DAC wurde bei 10 nM in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1% HFIP untersucht. Um die Dissoziation bzw. Entfaltung von DAC-A β (1-40) 10 nM genauer zu untersuchen, wurde eine Kinetik in 6 M Guanidinium, gelöst in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1% HFIP, durchgeführt.

c) Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen mit DAC-A β (1-40) und Fluos-IAPP-GI bzw. Fluos-IAPP

Um Unterschiede bei der Wechselwirkung von A β (1-40) mit IAPP-GI und A β (1-40) mit IAPP zu untersuchen, wurde eine weitere Bindungsstudie mittels der FRET-Technik durchgeführt. Als FRET bezeichnet man die strahlungslose Energieübertragung eines angeregten Fluoreszenzmoleküls auf ein anderes. Dabei wird die Energie, die von einem Donorfluorophor aufgenommen wurde, auf ein nahe gelegenes Akzeptorfluorophor übertragen, dessen Absorptionsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt. Bei einem Energietransfer, bedingt durch eine Bindung der Interaktionspartner, werden eine geringere

Fluoreszenz bei der Emissionswellenlänge des Donors und eine Erhöhung der Fluoreszenz des Akzeptors gemessen. Als geeignetes FRET-Paar wurde hier DAC und Fluorescein gewählt (DAC: Absorptionsmaximum bei 430 nm; Emissionsmaximum bei 465 nm; Fluorescein: Absorptionsmaximum bei 492 nm; Emissionsmaximum bei 522 nm).

Die Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. DAC-A β (1-40) und Fluos-IAPP-GI bzw. Fluos-IAPP wurden aus HFIP-Stammlösungen (10 μ M) zu dem Puffer dazugegeben (finale Konzentration 50 nM). Die Menge an HFIP im Natriumphosphatpuffer betrug 1%. Nach vorsichtigem Mischen wurde das Emissionsspektrum der Lösung zwischen 430 und 540 nm (Anregung bei 430 nm) innerhalb von 2-5 Minuten bei 25 °C aufgenommen.

2.5.3 CD-Spektroskopie

Der Circular dichroismus (CD) beschreibt die ungleiche Absorption von links- und rechtscircular polarisiertem Licht durch optisch aktive Moleküle, d. h. sie besitzen unterschiedliche Extinktionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R bezüglich den links- und rechtscircular polarisierten Wellen. Werden links- und rechtscircular polarisiertes Licht mit ungleicher Amplitude kombiniert, was z.B. durch unterschiedliche Absorption beider Strahlen in einem Medium geschieht, erhält man dabei elliptisch polarisiertes Licht. Der elektrische Feldvektor beschreibt dabei eine Ellipse [236].

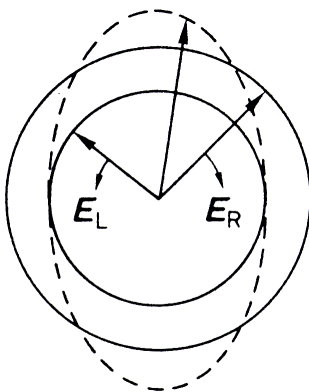


Abbildung 2.2: Elliptisch polarisiertes Licht

Sind die Amplituden der zwei circular polarisierten Wellen unterschiedlich entsteht elliptisches polarisiertes Licht. Quelle [236].

Bei der CD-Spektroskopie wird die Differenz der Absorption $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$, in die Elliptizität Θ , die Abhängig von der Wellenlänge ist, umgerechnet [236].

$$\Theta_\lambda = \text{konst} \times (\epsilon_L - \epsilon_R) \times c \times d \quad \text{Gl. 6}$$

Θ_λ : Elliptizität mit der Messeinheit Grad (englisch: degree)

konst: Konstanter Vorfaktor definiert durch $\ln 10 \times 180 / 2\pi$

ϵ : Extinktionskoeffizient in cm^2/g

c : Konzentration in g/cm^3

d : Schichtdicke der Küvette in cm

Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge des Lichts ergibt das CD-Spektrum. Es hat die Form einer Absorptionsbande, die als CD-Bande bezeichnet wird. Hier wird zwischen positiver und negativer CD-Bande unterschieden, je nachdem ob die rechts- oder linkscircular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird (Abbildung 2.3).

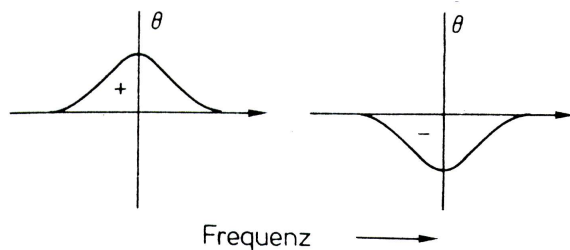


Abbildung 2.3: Positive und negative CD-Bande. Quelle [236].

Peptide sind optisch aktive Substanzen, da zunächst jede Aminosäure, mit Ausnahme von Glycin, ein optisch aktives C-Atom besitzt. Weiterhin zeigt ihre Gesamtkonformation Chiralität in Gestalt von α -Helices und β -Faltblättern. CD-Banden von Peptiden erscheinen in zwei spektralen Regionen. Im fernen UV-Bereich (170 nm bis 250 nm) wird die Absorptionseigenschaft der Peptidbindungen betrachtet, wohingegen die CD-Banden im nahen UV-Bereich (250 nm bis 300 nm) aus den aromatischen Aminosäuren stammen. Die CD-Banden in der Fern-UV-Region werden zur Konformationsanalyse von Peptiden herangezogen. Das CD-Spektrum einer α -Helix zeigt zwei negative Banden bei einer Wellenlänge von 207 und 222 nm und eine positive bei 192 nm (Abbildung 2.4). Peptide, die bei 215 bis 220 nm ein Minimum und bei 195 nm ein Maximum besitzen, haben eine β -Faltblattkonformation. Die ungeordnete Konformation eines Peptids liefert eine negative CD-Bande bei 198 nm. Die Messung des Circular Dichroismus im Absorptionsbereich der aromatischen Seitenketten kann dagegen Aufschluss über die Tertiärstruktur des Proteins geben.

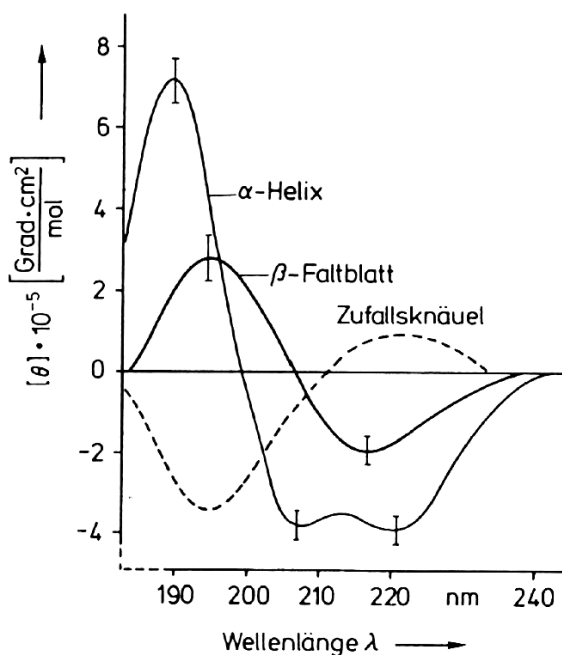


Abbildung 2.4: CD-Spektren des Poly-L-Lysin α -Helix in wässriger Lösung bei pH < 10,4; RT), β -Faltblatt bei pH < 10,4 und T = 50 °C) und Zufallsknäuel (pH > 10,4; RT). Quelle [240].

Die CD-Spektroskopie kann bei Peptiden nicht nur zur Konformationsanalyse, sondern auch zur Untersuchung von intermolekularen Wechselwirkungen herangezogen werden.

Um einen Vergleich der CD-Spektren verschiedener Peptide durchführen zu können, wird die Elliptizität auf die mittlere molare Masse der Aminosäurereste des untersuchten Peptids normiert. Die mittlere molare Elliptizität ist durch Gleichung 7 gegeben:

$$[\Theta]_{\lambda} = \frac{\Theta}{c \times N \times d} \quad \text{Gl. 7}$$

$[\Theta]_{\lambda}$: mittlere molare Elliptizität [$\text{Grad} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$]

Θ_{λ} : gemessene Elliptizität [Grad]

c: Konzentration des Peptids in [M]

N: Anzahl der Aminosäuren

d: Schichtdicke der Küvette in cm

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur von Insulin, IAPP und IAPP-GI sowie der Konformationsänderung nach Bindung der Peptide (Insulin/IAPP und Insulin/IAPP-GI) wurden Fern-UV-CD-Messungen mit einem AVIV 202SF Spektropolarimeter (Lakewood, NJ, USA) bei 25 °C durchgeführt. Aus 80 % HPLC-Puffer B lyophilisiertes Insulin wurde zunächst auf 200 µM in Wasser pH 2 gelöst und weiter im gleichen Lösungsmittel auf 20 µM verdünnt. IAPP und IAPP-GI wurden direkt in Wasser pH 2 auf 100 µM gelöst. Für die Mischungen wurde Insulin (20 µM, Wasser pH 2) auf trockenes IAPP bzw. IAPP-GI gegeben. Das Mischungsverhältnis betrug 1/5. Die verwendete Quarzküvette (Hellma, Müllheim) hatte eine Schichtdicke von 1 mm. Der aufgezeichnete Wellenlängenbereich verlief von 195 bis 250 nm. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 30 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm. Als Kontrolle und Hintergrundmessung wurde das Spektrum des Lösungsmittels (Wasser pH 2) aufgenommen. Die Spektren wurden nach Subtraktion des Hintergrundes ausgewertet. Zur Bestimmung der mittleren molaren Elliptizität wurde die Gleichung 7 (siehe oben) angewendet.

2.5.4 Immunogoldmarkierung

Um hetero-oligomere und/oder hetero-fibrilläre Aβ(1-40)/IAPP- und Aβ(1-40)/IAPP-GI-Komplexe sichtbar zu machen, wurden die einzelnen Peptide mit unterschiedlich großen Goldpartikeln markiert. Zuerst wurden 1/1-Mischungen und die Peptide allein (16,5 µM) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C bis zu 7 Tagen inkubiert. Die Fibrillenbildung der einzelnen Peptide und der Mischungen wurde mithilfe des ThT-Assays verfolgt (siehe Kapitel 2.4.3 a)). Nach 3 und 7 Tagen wurden 5 µl der Lösungen auf Formvar-Kohle beschichtete Kupfernetze (300 mesh, Science Services, München) gegeben. Nach einer Inkubation von 3 min wurde die Lösung mit einem Filterpapier abgesaugt. Die absorbierten Peptide wurden zunächst mit primären und danach mit sekundären Antikörpern, welche mit

Goldpartikeln versehen waren, behandelt. Zum Blockieren, Inkubieren mit den Antikörpern und Waschen der Kupfernetze, wurden 20 µl-Tropfen der entsprechenden Lösung auf Parafilm-umwickelte Objektträger pipettiert. Die Kupfernetze wurden mit der peptidbeschichteten Seite nach unten auf diese Tropfen gelegt. Nach der Inkubation mit dem Blockierungspuffer (15 min) wurden die Kupfernetze 3-mal gewaschen und für 20 min mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung mit Blockierungspuffer; 1/100) behandelt. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Inkubation (20 min) mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung mit Blockierungspuffer; 1/20). Zuletzt wurden die Kupfernetze je 3-mal mit Waschpuffer und H₂O gewaschen. Die Untersuchung der heterogenen Komplexe wurde mittels TEM (Kapitel 2.5.5) durchgeführt.

Tabelle 2.4: Blockierungs- und Waschpuffer für die Immunogold-Markierung

Blockierungspuffer (1×PBS pH 7,4 + BSA)	Konzentration/ Menge	Waschpuffer (1×PBS pH 7,4)	Konzentration/ Menge
NaCl	137 mM	NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM	KCl	2,7 mM
KH ₂ HPO ₄	1,5 mM	KH ₂ HPO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
BSA	0,1 %		

Primärantikörper:

rabbit anti-Amylin (IAPP), Bachem (Weil am Rhein)

mouse anti-human β-Amyloid [1-17] Clone 6E10, Sigma-Aldrich (Steinheim)

Sekundärantikörper:

anti-mouse IgG gold conjugate 5 nm, Sigma-Aldrich (Steinheim)

anti-rabbit IgG gold conjugate 10 nm, Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.5.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für den Nachweis fibrillärer Strukturen wurden Proteinproben auf Formvar-Kohle beschichtete Kupfernetze (300 mesh, Science Service, München) adsorbiert und anschließend mit einem Philips EM 400 Elektronenmikroskop untersucht. Die Netze wurden auf der beschichteten Seite mit der zu untersuchenden Proteinlösung (1 bis 5 µg) für 3 min inkubiert und anschließend 1 min mit Wasser gewaschen. Um den Kontrast während der Untersuchung zu erhöhen wurden die Netze mit einer wässrigen 2 %igen Uranyl-Acetat-lösung für eine weitere Minute inkubiert und mittels TEM untersucht. Die TEM-Aufnahmen wurden von Frau Prof. Dr. Kapurniotu angefertigt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

a) Bradford-Assay

Vor der Immunopräzipitation zur Detektion des phosphorylierten Insulinrezeptors (siehe Kapitel 2.6.5) wurde die Proteinkonzentration in den MDA-MB-468-Zelllysaten nach der Methode von Bradford bestimmt [241]. Als Farbstoff wird das Coomassie-Brillantblau verwendet, welches mit kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine wechselwirken kann. Durch diese Bindung verschiebt sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum des blauen Farbstoffs von 465 zu 595 nm.

Bei der Proteinbestimmung wurde das Protein-Assay-Reagenz (Biorad, München) verwendet, welches 1:5 mit bidest. H₂O verdünnt wurde. Die Zelllysate wurden nach 5facher Verdünnung in bidest. H₂O mit der frisch hergestellten Bradford-Lösung im Verhältnis 1:50 gemischt und für 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption an einem Cary Bio1 UV-Vis Spektrometer (Varian, Darmstadt) bei 595 nm gegen die entsprechende Referenzlösung gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA Eichgeraden ermittelt.

b) Mikro BCA-Test

Für die Konzentrationsbestimmung der synthetisierten und gereinigten Peptide IAPP, IAPP-GI, Biotin-IAPP-GI und A β (1-40) wurde der Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Diese Methode basiert auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ in alkalischer Umgebung (Biuret-Reaktion) durch die Aminosäuren Cystein, Tyrosin, Tryptophan und durch Peptidbindungen. Bicinchoninsäure (BCA) bildet spezifisch mit Cu⁺ einen Farbkomplex [242]. Dies ermöglicht einen sensitiven, colorimetrischen Nachweis von Peptiden bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für jede Messreihe wurde zunächst eine Eichreihe des kommerziell erhältlichen IAPP bzw. A β (1-40) bekannter Konzentration von 10 pg/ μ l bis 50 pg/ μ l in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 hergestellt. Die zu messenden Proben wurden so verdünnt, dass sie ungefähr im gleichen Konzentrationsbereich lagen. 50 μ l aller Lösungen wurden in einer 96-Well Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) pipettiert. Zu jedem Well wurden 150 μ l der Arbeitslösung zugegeben, das aus 25 Teilen des Reagenz A (basischer Puffer), 24 Teilen Reagenz B (BCA-Lösung) und 1 Teil Reagenz C (Kupfersulfatlösung) bestand und jeweils frisch angesetzt wurde. Die 96-Well Platte wurde 1 bis 2 h bei 37 °C inkubiert, und anschließend die Absorption bei 570 nm gemessen.

2.6.2 Crosslinking von Homo- und Heterokomplexe durch Glutardialdehyd

Das Crosslinking ist eine Methode, mit deren Hilfe Peptid/Proteinkomplexe durch Zugabe eines Quervernetzers (Crosslinker) stabilisiert werden können. Die kovalent vernetzten Proteinkomplexe können anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Crosslinking durchgeführt, um die Größe der A β (1-40)-, A β (1-42)-, IAPP-GI-Oligomere und A β /IAPP-GI-Heterokomplexe zu charakterisieren. Des Weiteren wurden mit dieser Methode auch die Insulin/IAPP-GI-Heteroaggregate untersucht. Das Quervernetzen erfolgte mit Glutaraldehyd (GA). Es gehört zu den am häufigsten verwendeten Crosslinker. GA ist der Trivialname für Pentan-1,5-dial. Wie der Name bereits vorgibt, besitzt GA zwei Aldehydgruppen, eine befindet sich am C1-Atom, die andere am C5-Atom. Zwischen den Aminoseitengruppen der Lysin- und Arginin-Reste und den Aldehydgruppen können sich kovalente Brückenbindungen ausbilden. Dadurch können verschiedene Moleküle bzw. verschiedene Einheiten eines Komplexes, die sich in räumlicher Nähe befinden, zusammengehalten werden.

a) Crosslinking der A β /IAPP-GI- Heterokomplexe

Für das Crosslinking wurde ein Reaktionsansatz von 30 μ l je Peptid (50 μ M) und 1/1-Mischungen in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 angesetzt. Hierfür wurden zunächst entsprechende Peptidmengen aus HFIP-Stammlösungen in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt. Für die 1/1-Mischungen wurde A β (1-40) bzw. A β (1-42) mit IAPP-GI in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das HFIP wurde aus allen Proben mit Stickstoff verdampft. Die Peptide wurden in 30 μ l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert. Alle Lösungen wurden zur Ausbildung der Oligomere und Komplexe zunächst 3 Stunden bei 25 °C inkubiert. Danach wurden zu jeder Probe 20 μ l einer 25 %igen Glutardialdehyd/Wasser-Lösung zugegeben. Das Stoppen der Quervernetzung erfolgte nach 2 min durch die Zugabe von einer 12,5 μ l NaBH₄-Lösung (2 M in 0,1 M NaOH). Nach weiteren 20 min bei 25 °C wurden zum Fällern der Peptide in jedes Reaktionsgefäß 11,5 μ l einer 10%igen TCA-Lösung pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 10 Minuten. Das Pellet wurde in 45 μ l SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.6.6) aufgenommen, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach anschließendem Western Blotting wurden die Banden mit protein-spezifischen Antikörpern detektiert (2.6.7 a)). Der Nachweis von A β (1-42) wurde auch mit einer Silberfärbung durchgeführt (Kapitel 2.6.8). Die Größe der Oligomere und Heterokomplexe konnten mithilfe eines Multimarkers 3 - 185 kDa (Invitrogen, Eggenstein) bestimmt werden.

b) Crosslinking der Insulin/IAPP-GI-Heteroaggregate

Insulin wurde in 80 % HPLC-Puffer B (1 mg/ml) gelöst, aliquotiert und lyophilisiert (2.2.6). Zuerst wurde eine 200 μ M Insulinstammlösung in Wasser pH 2 hergestellt und diese weiter im gleichen Lösungsmittel auf 20 μ M verdünnt. Zur Herstellung der Insulin/IAPP-GI-Mischungen wurde 20 μ M Insulin zu trockenem IAPP-GI dazugegeben. Insulin (20 μ M, 100 μ l), Insulin/IAPP-GI (20 μ M/ 100 μ M, 100 μ l) und IAPP-GI (100 μ M, 100 μ l) wurden in Wasser pH 2 für 24 h bei 60 °C inkubiert. Zu jeder Probe wurden anschließend 60 μ l einer 25 %igen Glutardialdehyd/Wasser-Lösung zugegeben. Das Stoppen der Quervernetzung erfolgte nach 2 h (25 °C) durch die Zugabe einer 37,5 μ l NaBH₄-Lösung (2 M in 0,1 M NaOH). Nach weiteren 20 min bei 25 °C wurden zum Fällern der Peptide in jedes Reaktionsgefäß 75 μ l einer 10%igen TCA-Lösung pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Lösungen bei 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 μ l SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.6.6) aufgenommen. Die saure Inkubationslösung der Insulinproben und Mischungen wurde durch den Probenpuffer neutralisiert. Nach dem Erhitzen der Lösungen auf 95 °C für 5 min, wurden die Komplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach anschließendem Western Blotting wurden die Banden mit proteinspezifischen Antikörpern detektiert (2.6.7 a)). Die Größe der Oligomere und Heterokomplexe konnten mithilfe eines Multimarkers 3 - 185 kDA (Invitrogen, Eggenstein) bestimmt werden.

2.6.3 Biotin-pull-down-Assay

Um Peptid/Peptid-Interaktionen zu untersuchen, kann ein so genannter Biotin-pull-down-Assay durchgeführt werden. Bei dieser Technik wird eines der Peptide mit Biotin markiert und mit seinem potentiellen Bindungspartner inkubiert. Findet eine Interaktion zwischen den Peptiden statt kann der Komplex durch Streptavidin-beschichtete Beads aus der Lösung isoliert und die Peptide durch SDS-PAGE und Western-Blotting mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde der Biotin-pull-down-Assay durchgeführt, um die Interaktion zwischen A β (1-40) bzw. A β (1-42) und IAPP-GI nachzuweisen. Die Biotinylierung von IAPP-GI ist in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Es wurden folgende Proben in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 hergestellt: Mischungen von 2,5 μ M Biotin-IAPP-GI mit 5 μ M A β (1-40) bzw. A β (1-42); Biotin-IAPP-GI (2,5 μ M) allein zur Kontrolle der Bindung an den Streptavidin-beschichteten Beads und die Amyloid- β -Peptide allein zur Bestimmung der unspezifischen Bindung an den Beads (Probenvolumen 250 μ l).

Zusätzlich wurde frisch gelöstes (t = 0) und vorinkubiertes A β (1-40) (16,5 μ M; t = 24 h und 144-288 h) zu trockenem IAPP-GI in einem Mischungsverhältnis von 2/1 dazugegeben (Probenvolumen 50 μ l). Die Arbeitsschritte zur Herstellung der Peptidlösungen sind in den Kapiteln 2.4.3 a) und 2.6.2 beschrieben. Die Proben wurden zunächst 1 h bei 25 °C stehen

gelassen, dann zu 25 μ l geblockte Streptavidin-beschichtete magnetische Beads (Dynabeads M-280, Dynal Biotech/Invitrogen, Eggenstein) gegeben und eine weitere Stunde bei 25 °C unter Rotation der Eppendorf-Reaktionsgefäße inkubiert. Das Blockieren der Beads erfolgte mit einer 0,25 %igen BSA/TBSn-Lösung. Die Abtrennung der Beads von der Lösung erfolgte mit einem speziellen Magnethalter (Magnetic Particel Concentrator (MPC), Dynal A. S., Oslo, Norway). Nach 4 Waschschritten mit HNT-Puffer wurden die Beads in 50 μ l SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.6.6) aufgenommen, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und die Überstände auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Auftrennung und dem Western Blotting wurden die Peptide durch Antikörper nachgewiesen (2.6.7 a)). Zur Detektion von A β (1-42) wurde zusätzlich eine Silberfärbung des Gels durchgeführt (Kapitel 2.6.8).

Tabelle 2.5: Bestandteile des TBSn-Puffers pH 7,4 (1 $\times$)

TBSn-Puffer pH 7,4	Konzentration/ Menge
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 %

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des HNT-Puffers pH 7,7

HNT-Puffer pH 7,7	Konzentration/ Menge
Hepes	25 mM
NaCl	0,1 M
Triton TX-100	0,5 %

2.6.4 Insulin-Oligomerisierungs Assay

Die Experimente zur Untersuchung der Insulin-Oligomerisierung wurden von Marianna Tatarek-Nossol durchgeführt [278]. Zur Herstellung von nicht-fibrillären Oligomeren wurde Insulin in 80 % HPLC-Puffer B (1 mg/ml) gelöst, aliquotiert und lyophilisiert (2.2.6). Zuerst wurde eine 200 μ M Insulinstammlösung in Wasser pH 2 hergestellt und diese weiter im gleichen Lösungsmittel auf 20 μ M verdünnt. Um den inhibitorischen Effekt von IAPP, IAPP-GI und Parathyroidhormon auf die Insulin-Oligomerisierung zu untersuchen, wurde ein Teil der 20 μ M Insulinlösung zu trockenem Peptid (5-facher Überschuss) dazugegeben. Alle Proben wurden bei 60 °C für 24 h oder 48 h gelagert. Nach der Inkubationszeit wurden die gealterten Peptidlösungen im Polyacrylamid-Gel, ohne Zugabe von DTT und ohne das Aufkochen der Proben, elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.6.6) und nach dem Western Blotting mit Hilfe eines anti-Insulin Antikörpers nachgewiesen (Kapitel 2.6.7 a)).

2.6.5 Immunpräzipitation

Zur Anreicherung bestimmter Proteine aus Zelllysaten werden spezifische, an Protein A-Sepharose-Beads (Amersham Biosciences (Freiburg)) gekoppelte Antikörper eingesetzt, mit denen Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen binden kann. Anhand dieser Methode wird die Isolierung des Protein-Antikörper-Immunkomplexes aus Lösungen erleichtert [243].

Die Immunpräzipitation wurde hier angewendet, um die Phosphorylierung des Insulinrezeptors (IR) nach Stimulierung der MDA-MB-468 Zellen mit Insulin und einer Insulin/IAPP-GI-Mischung (siehe Kapitel 2.3.4 f)) nachzuweisen. Hierfür wurden die Zelllysate 10 min bei 14000 g (4°C) zentrifugiert und die Überstände (500 µl; Gesamtprotein: 1,5 mg) mit 7,5 µg mouse anti-Phosphotyrosine Antikörper Clone PY20 (BD Transduction Laboratories, Heidelberg) versetzt. Die Proben wurden anschließend über Nacht bei 4°C rotiert. Nach der Zugabe von geblockten Sepharose A Beads (120 µl) wurden die Ansätze für weitere 12 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Das Blockieren der Beads wurde mit einer 1,5 %igen BSA/TBS-Lösung durchgeführt. Die Beads wurden 4-mal mit TBS-Puffer, 1-mal mit Wasser gewaschen, in 60 µl 2×SDS-Probenpuffer (2.6.6) aufgenommen und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach dem Western Blotting (Kapitel 2.6.7 b) die β-Untereinheit des Tyrosin-phosphorylierten IRs mit Hilfe eines spezifischen rabbit anti-Insulinrezeptor, β-Untereinheit Antikörpers (Millipore, Schwalbach), welcher an die letzten 100 C-terminalen Aminosäuren des humanen IRs bindet, nachgewiesen.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des TBS-Puffers pH 7,4

TBS-Puffer pH 7,4	Konzentration/ Menge
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM

2.6.6 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-Gelelektrophorese werden Proteine nach unterschiedlichen Molekülgrößen aufgetrennt [244]. Bei dieser Methode werden die Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) beladen. Dadurch entstehen negativ geladene SDS/Protein-Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis. Bei der Probenaufarbeitung werden die Proteinlösungen mit einem Überschuss an SDS auf 95 °C erhitzt. Dadurch werden die Wasserbrücken aufgespalten und die Moleküle gestreckt, die Sekundär- und Tertiärstruktur ist aufgelöst. Durch den Zusatz von reduzierenden Thiolverbindungen, z.B. β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) werden Schwefel-gruppen zwischen Cysteinen

gespalten. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen SDS/Protein-Komplexe zum Plus-Pol und werden durch den Molekularsiebeffekt in der Polyacrylamidmatrix nach ihrer Masse getrennt.

Um eine hohe Auflösung bei der Proteintrennung zu erreichen, wurde hier die von U. K. Laemmli eingeführte diskontinuierliche SDS-Elektrophorese durchgeführt [245]. Es wurde das NuPAGE-System von Invitrogen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, welches Bis-Tris-HCl gepufferte Gradientengele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 4-12% beinhaltet. Die in Lauryldodecylsulfat (LDS)-Probenpuffer aufgekochten Proben wurden bei 200 V in NuPAGE/XCell SureLock-Kammern aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde der NuPAGE-MES-running buffer verwendet.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des LDS-Probenpuffers

LDS-Probenpuffer	Konzentration
LDS sample buffer (4 x) (Nupage®)	20 g/l
1 M DTT (20 x)	7,7 g/l

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des Laufpuffers

Laufpuffer	Konzentration/ Menge
MES-running buffer (20 x) (Nupage®)	5 %
Antioxidant (Nupage®)	0,25 %

2.6.7 Western-Blotting

Das Western-Blotting dient dazu, die in einem Gel aufgetrennten Proteine über Elektrotransfer auf einen Träger zu übertragen und für die nachfolgende Immunodetektion zu immobilisieren [246].

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden hier zunächst auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schuell, Dassel) unter Verwendung der XCell II Blot Module (Invitrogen, Karlsruhe) geblottet. Der Elektrotransfer wurde unter Kühlung bei 30 V für 90 min durchgeführt. Zur Absättigung der noch freien Proteinbindungsstellen wurden die Membranen nach dem Blotten zunächst mit Blockierungspuffer 1 h bei 25 °C geschwenkt. Die Immundetektion erfolgte durch die Inkubation mit Primärantikörper (in Blockierungspuffer) für 2 h bei 25 °C oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Membranen 3-mal mit Waschpuffer gewaschen und für 1 h bei 25 °C mit Sekundärantikörper (in Blockierungspuffer) geschwenkt. Nach erneutem Waschen wurden die Proteinbanden durch Zugabe der ECL-Lösung am LAS 3000 Image Reader (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert. Das ECL-Detektionssystem basiert auf die Aktivierung der am sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase, welche die Oxidation des Luminols (Bestandteil des ECL-Systems)

katalysiert und somit eine Chemilumineszenz auslöst. Die densitometrische Auswertung der Western-Blots erfolgte mit der AIDA Image Analyzer Software.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des Transferpuffers

Transferpuffer	Konzentration/ Menge
Transfer Buffer 20x (Nupage®)	5 %
Methanol	10 %

Für die einzelnen Detektionen wurden folgende Antikörper und Puffer verwendet:

a) Nachweis der Amyloid- β -Peptide (1-40), (1-42), Insulin, IAPP, IAPP-GI und Biotin-IAPP-GI nach Cross-linking, Biotin-pull-down- und Insulin-Oligomerisierungs-Assay

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des Blockierungs- und Waschpuffers

Blockierungspuffer	Konzentration/ Menge	Waschpuffer	Konzentration/ Menge
Tris/HCl	20 mM	Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 %	Tween 20	0,05 %
Milchpulver	5 %		

Primärantikörper:

rabbit anti-Amylin (IAPP), Bachem (Weil am Rhein)

rabbit anti-Amyloid β -Protein (1-40), Sigma-Aldrich (Steinheim)

mouse anti-Insulin, Sigma-Aldrich (Steinheim)

Sekundärantikörper:

donkey anti-rabbit IgG-POD, Amersham Biosciences (Freiburg)

sheep anti-mouse IgG-POD, Amersham Biosciences (Freiburg)

Streptavidin-POD Konjugat, Roche (Mannheim)

b) Detektion des phosphorylierten Insulinrezeptors nach Immunopräzipitation

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Blockierungs- und Waschpuffers für die Detektion des phosphorylierten IRs

Blockierungspuffer	Konzentration/ Menge	Waschpuffer	Konzentration/ Menge
Tris/HCl	20 mM	Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
Milchpulver	3 %		

Primärantikörper:

rabbit anti-IR β -subunit, Millipore (Schwalbach)

Sekundärantikörper:

donkey anti-rabbit IgG-POD, Amersham Biosciences (Freiburg)

c) Nachweis von Aktin in MDA-MB-468 Zelllysate

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Blockierungs- und Waschpuffers für die Detektion von Aktin

Blockierungspuffer	Konzentration/ Menge	Waschpuffer	Konzentration/ Menge
Tris/HCl	20 mM	Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
Milchpulver	3 %	Tween 20	0,01 %

Primärantikörper:

mouse anti-Aktin, MP Biomedicals, Eschwege

Sekundärantikörper:

sheep anti-mouse IgG-POD, Amersham Biosciences, Freiburg

d) Detektion von Akt und pAkt in MDA-MB-468 Zelllysate

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Blockierungs- und Waschpuffers für den Nachweis von Akt und pAkt

Blockierungspuffer	Konzentration/ Menge	Waschpuffer	Konzentration/ Menge
Tris/HCl	20 mM	Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
BSA	1 %	Tween 20	1 %

Primärantikörper:

rabbit anti-Akt, Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

rabbit anti-phosphoAkt (Thr 308), Cell Signaling (Schwalbach)

Sekundärantikörper:

goat anti-rabbit IgG-POD peroxidase, Pierce, Rockford (IL, USA)

2.6.8 Silberfärbung

Zur Visualisierung der A β (1-42)-Banden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamid-Gel wurde nicht nur das Western-Blotting Verfahren mit anti-A β (1-40) Antikörper angewandt, sondern auch eine Silberfärbung durchgeführt [247, 248]. Bei dieser Färbemethode binden die positiv geladenen Silberionen (Ag⁺) an Glutamin-, Asparagin- und Cysteinreste der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag⁺ zu Ag, welches die Proteine im Gel braun-schwarz färbt. Die Silberfärbung kann nur eingeschränkt zur

Quantifizierung von Proteinen eingesetzt werden, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität gefärbt werden; einige Histone z.B. sind mit dieser Methode nicht detektierbar.

Nach der NuPAGE-Elektrophorese wurden zunächst die Peptide mit einer 20 %igen TCA-Lösung (30 min) im Gel fixiert. Anschließend erfolgten zwei 10minütige Inkubationen in 50 % Methanol und drei Waschschrte mit dest. H₂O. Zum Färben wurde das Gel 20 min mit folgender Lösung behandelt: 0,12 mg/ml AgNO₃, 25 %iger Ammoniak, 0,36 % NaOH. Nach drei Waschschrten mit dest. H₂O wurde das Gel zur Reduktion der Silberionen in Formaldehyd (37 %) und Citronensäure (1 %) inkubiert. Die Färbung wurde durch Waschschrte mit 50 % Methanol gestoppt.

3 Ergebnisse

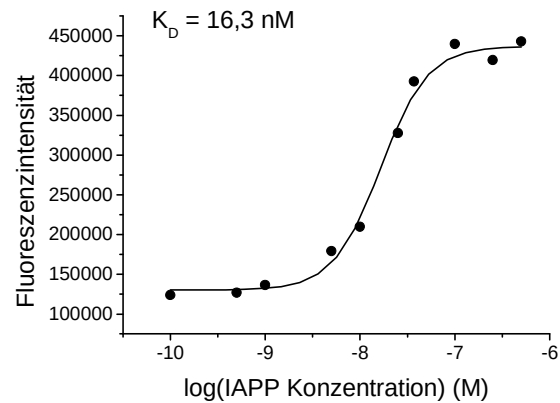
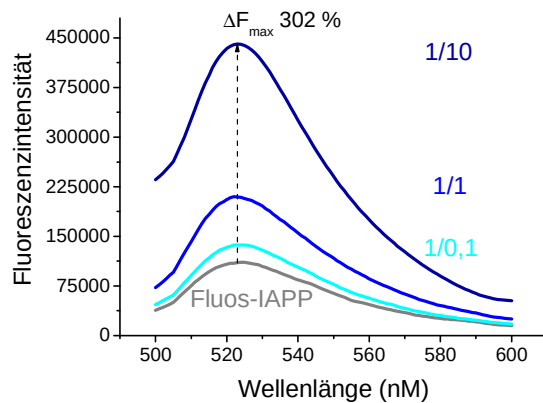
3.1 Selbst- und Heteroassoziation von IAPP und den IAPP-Analoga

In Vorstudien der Arbeitsgruppe wurden die IAPP-Analoga IAPP-FA, IAPP-GI, IAPP-AL und IAPP-IL als potentielle Inhibitoren der zelltoxischen Aggregation des humanen Inselamyloid-Polypeptids (IAPP) untersucht. Es wurde gezeigt, dass IAPP-GI die Bildung von toxischen IAPP-Oligomeren und IAPP-Fibrillen am effektivsten inhibieren kann [96]. IAPP-GI selbst wurde als ein nicht-amyloides und nicht-toxisches IAPP-Analogon charakterisiert [97].

Um zu untersuchen, ob die IAPP-Analoga mit sich selbst wechselwirken und die daraus resultierenden Dissoziationskonstanten (K_D) bestimmen zu können, wurden hier mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie Bindungsstudien durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays besteht darin, N^α-aminoterminal Fluorescein-markierte Peptide (Fluos-Peptid) mit unmarkiertem Ligand zu titrieren. Durch die Wechselwirkung der Peptide kann die Umgebung des Fluorophors verändert werden, was zu einer Zu- oder Abnahme seiner Fluoreszenzemission führen kann. Damit die Peptide zu Beginn eines Experiments in einem nicht-aggregierten Zustand sind, wurden Stammlösungen in Hexafluorisopropanol (HFIP) hergestellt. Zusätzlich wurden die Fluorescein-markierten Peptide kurz vor der Messung mittels HPLC aufgereinigt. Vorhandene Aggregate, welche die Messung verfälschen könnten, wurden somit abgetrennt. Als erstes wurde die Selbstassoziation des IAPP untersucht. Die Messung wurde in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP durchgeführt. Um das Fluos-IAPP vor der Bindung mit IAPP in einem möglichst nicht-aggregierten Zustand zu halten, wurde dessen Konzentration zunächst auf 10 nM gesetzt. Nach Zugabe des Fluos-IAPP und des nicht-markiertem IAPP zum Puffer, wurde innerhalb von 2-5 Minuten, bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm, das Emissionsspektrum zwischen 500 und 600 nm aufgenommen. Mit steigender Konzentration an IAPP wurden erhöhte Emissionen des Fluoresceins gemessen (Abbildung 3.1 A links). Bei einem 100-fachen Überschuss an IAPP wurde die höchste Fluoreszenzänderung erreicht ($\Delta F_{\max}$ 302 %). Die Fluoreszenzwerte bei einer Wellenlänge von 522 nm wurden gegen die IAPP-Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.1 A rechts). Aus dieser sigmoidalen Bindungskurve wurde über eine Kurvenanpassung (siehe Kapitel 2.5.2) eine Dissoziationskonstante (K_D) von 16,3 nM berechnet. Um zu überprüfen, ob Fluos-IAPP bei einer Konzentration von 10 nM in einem stabilen Zustand vorliegt oder bereits mit sich selbst assoziiert ist, wurde die Messung auch mit 1 nM Fluos-IAPP durchgeführt. Auch hier erhöhte sich die Fluoreszenzintensität des Fluoresceins nach Zugabe von IAPP (Abbildung 3.1 B). Es wurde eine K_D von 9,7 nM berechnet. Diese Daten zeigen, dass Fluos-IAPP bei 10 nM bereits in einer teilweise aggregierten Form vorliegt. Alle weiteren Messungen wurden daher bei 1 nM der Fluorescein-markierten Peptide durchgeführt.

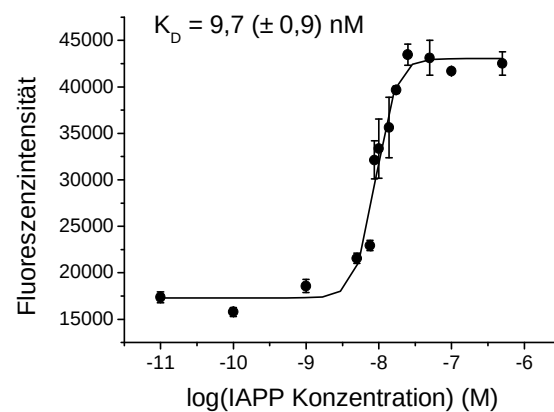
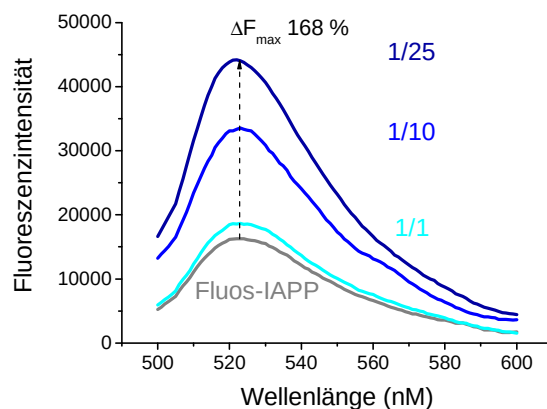
A

Fluos-IAPP 10 nM + IAPP



B

Fluos-IAPP 1 nM + IAPP

**Abbildung 3.1:** Selbstassoziation des IAPP.

Fluos-IAPP wurde bei einer Konzentration von 10 nM (A, $n = 1$) und 1 nM (B, $n = 3$) mit IAPP titriert. Die Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt. Links sind die Emissionsspektren (das Hintergrundsignal des Puffers wurde abgezogen) von Fluos-IAPP allein und nach der Zugabe von IAPP dargestellt. Die maximale Fluoreszenzänderung ist bei einem entsprechenden Überschuss an IAPP angegeben. Die Fluoreszenzintensität bei 522 nm wurde gegen die IAPP-Konzentration aufgetragen. Anhand dieser Titrationskurven (rechts) wurden die K_D berechnet. Bei der dreifachen Bestimmung wurde zunächst die K_D von jeder einzelnen Messung berechnet und daraus der Mittelwert ($\pm$ SEM) gebildet.

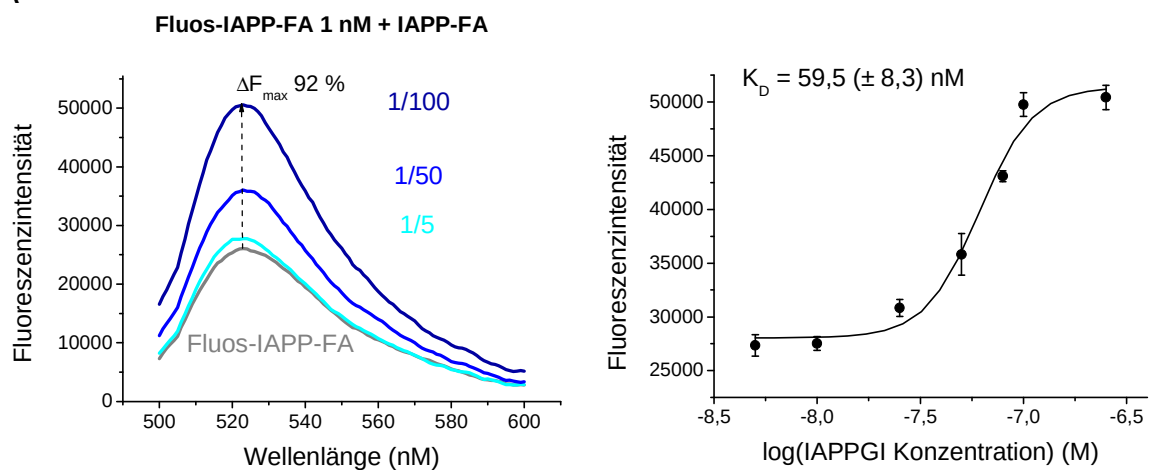
Die Messungen mit den IAPP-Analoga zeigten, dass diese Sequenzen, ähnlich wie IAPP dazu neigen, im niedrigen nanomolaren Bereich mit sich selbst zu assoziieren. In Abbildung 3.2 sind die Emissionsspektren und die Bindungskurven dargestellt. Diese Daten zeigen, dass IAPP-GI von allen Analoga die niedrigste K_D hat. Die maximale Fluoreszenzänderung ($\Delta F_{\max}$) liegt bei der Fluos-IAPP-FA/IAPP-FA-, Fluos-IAPP-GI/IAPP-GI- und Fluos-IAPP-LA/IAPP-LA-Wechselwirkung zwischen 80 bis 90 %. Dagegen wird bei der Bindung von Fluos-IAPP-IL an IAPP-IL ein $\Delta F_{\max}$ von 52 % erreicht.

In den oben erwähnten Vorstudien wurde auch der Effekt von IAPP aus Ratten (rIAPP) auf die toxische Aggregation des humanen IAPP untersucht. Dieses IAPP-Analogon hatte wenig

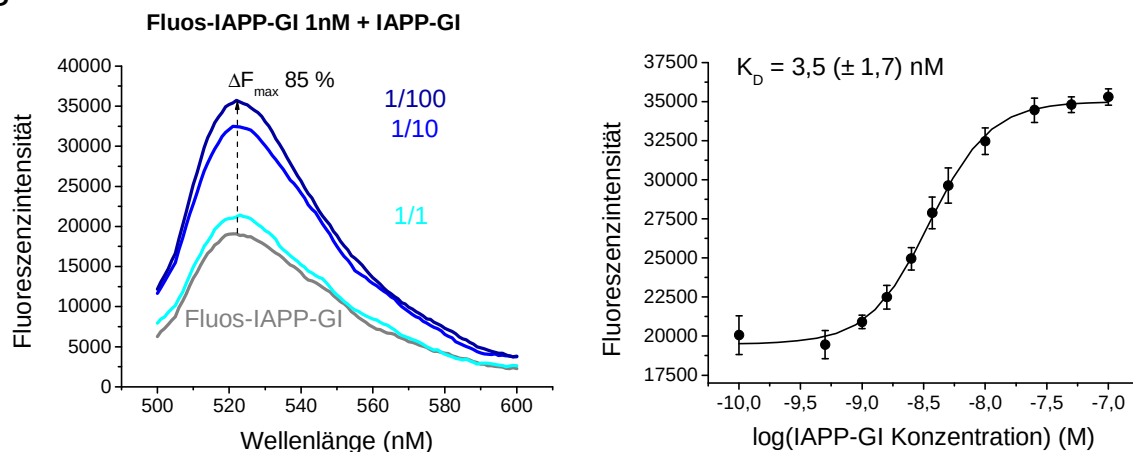
Einfluss auf die Bildung toxischer IAPP-Aggregate und wurde anhand dieser Ergebnisse als eine Negativkontrolle angegeben [97]. Im Gegensatz zu humanem IAPP kann rIAPP, aufgrund der Prolinreste in seiner Sequenz, keine fibrillären Strukturen ausbilden [77]. Die Fluos-rIAPP/rIAPP-Wechselwirkung wurde hier ebenfalls untersucht. Die Messung zeigte, dass auch rIAPP, trotz der fehlenden Eigenschaft Fibrillen zu bilden, dazu neigt mit einer K_D von 3,6 nM mit sich selbst zu assoziieren.

In Tabelle 3.1 sind zum Vergleich die Selbstassoziationskonstanten von IAPP und seinen Analoga zusammengefasst. Alle Peptide können im niedrigen nanomolaren Bereich mit sich selbst assoziieren. IAPP-GI und rIAPP haben eine niedrigere K_D als IAPP und IAPP-IL. Die Selbstassoziationskonstante des IAPP-FA und IAPP-AL ist sechs- bzw. dreimal höher als die des IAPP.

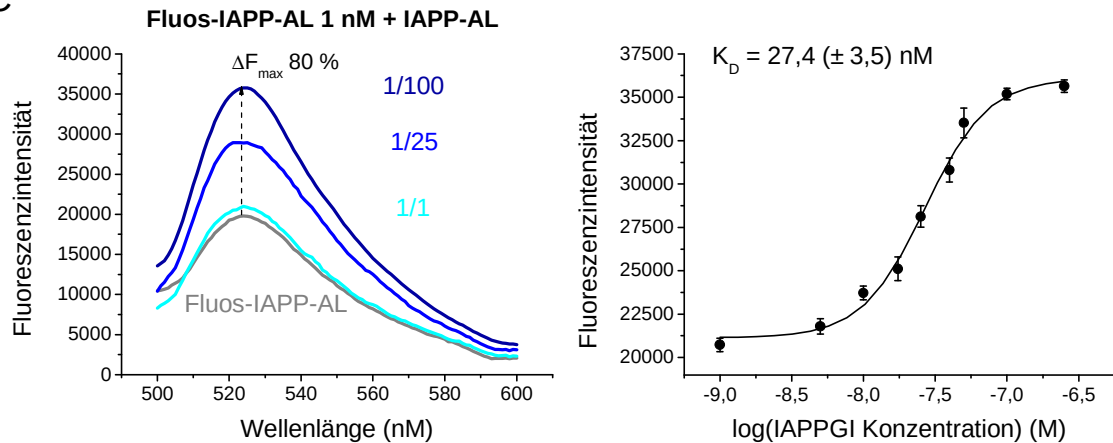
A



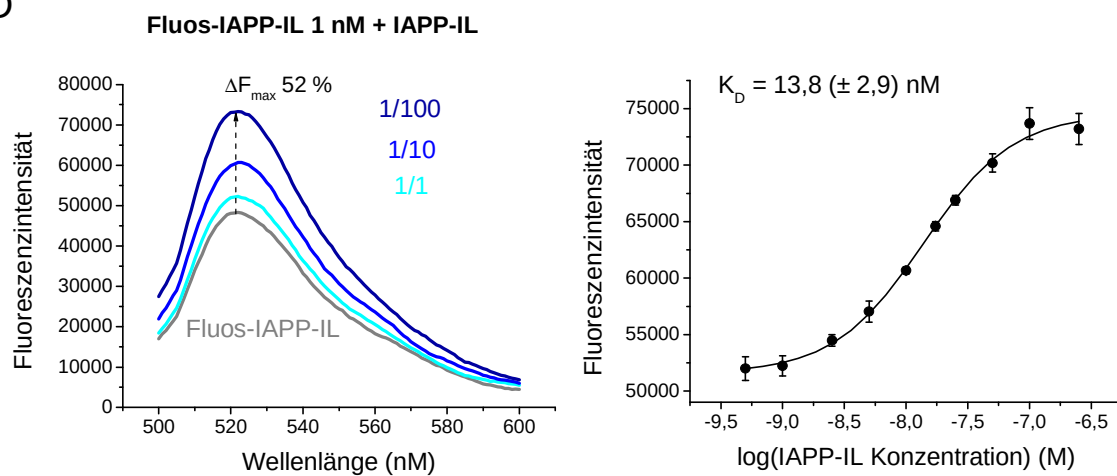
B



C



D



F

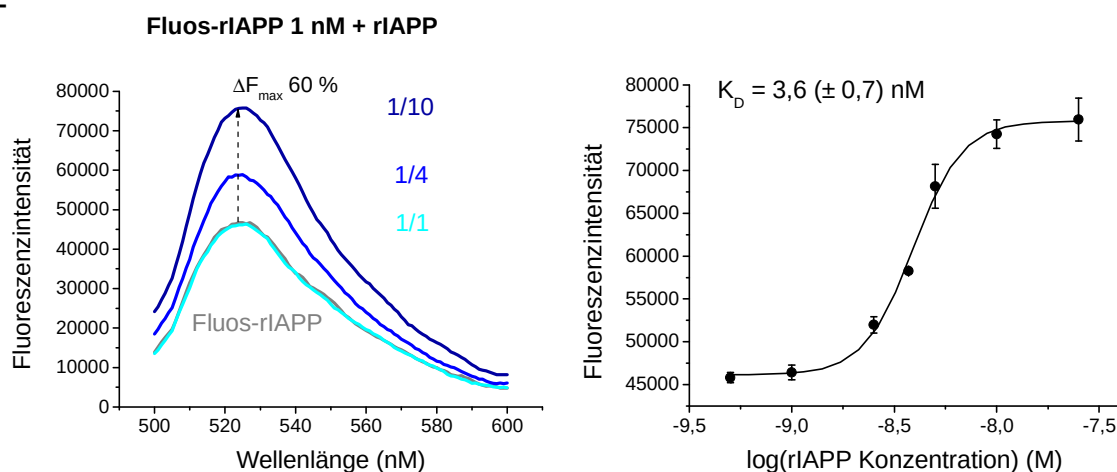


Abbildung 3.2: Selbstassoziation der IAPP-Analoga.

IAPP-FA (A), IAPP-GI (B), IAPP-AL (C), IAPP-IL (D) und rIAPP (E). Fluorescein-markierte Peptide (1 nM) wurden mit den entsprechenden unmarkierten Peptiden titriert. Es wurden Änderungen der Fluoreszenzintensität des Fluorophors gemessen. Die Emissionsspektren sind links dargestellt. Von jedem Spektrum wurde das Hintergrundsignal des Puffers abgezogen. Die maximale Fluoreszenzänderung (bei 522 nm) ist bei dem entsprechenden Überschuss an unmarkiertem Peptid angegeben. Alle Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt. Die Titration wurde

für jedes Analogon dreimal durchgeführt und die Selbstassoziationskonstanten bestimmt (rechts). Aus diesen drei Werten wurde der Mittelwert der K_D ($\pm$ SEM) berechnet.

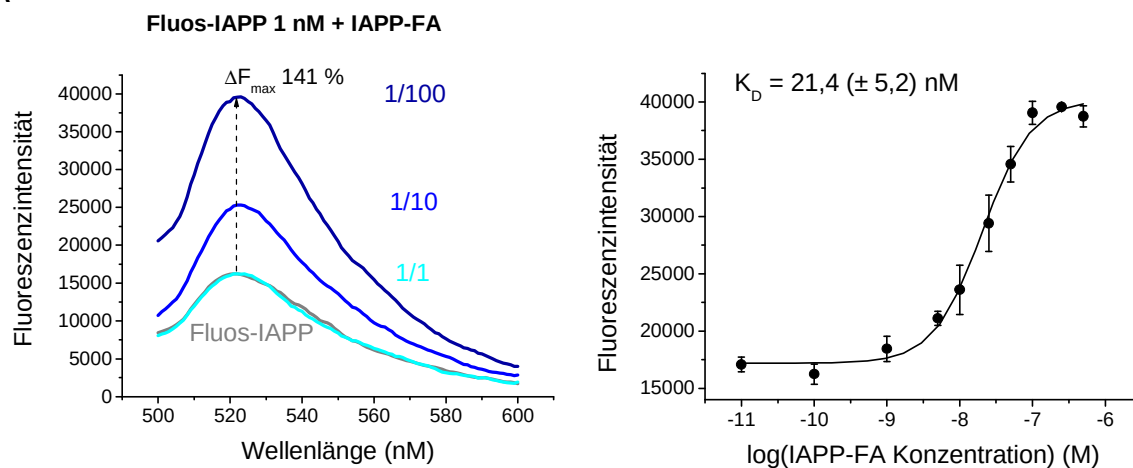
Tabelle 3.1: Selbstassoziation von IAPP, IAPP-FA, IAPP-GI, IAPP-AL, IAPP-IL und rIAPP.

Mittelwert ($\pm$ SEM) der Selbstassoziationskonstanten wurden aus $n = 3$ Titrationsen berechnet. Die Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt. Die Konzentration der Fluorescein-markierten Peptide betrug 1 nM.

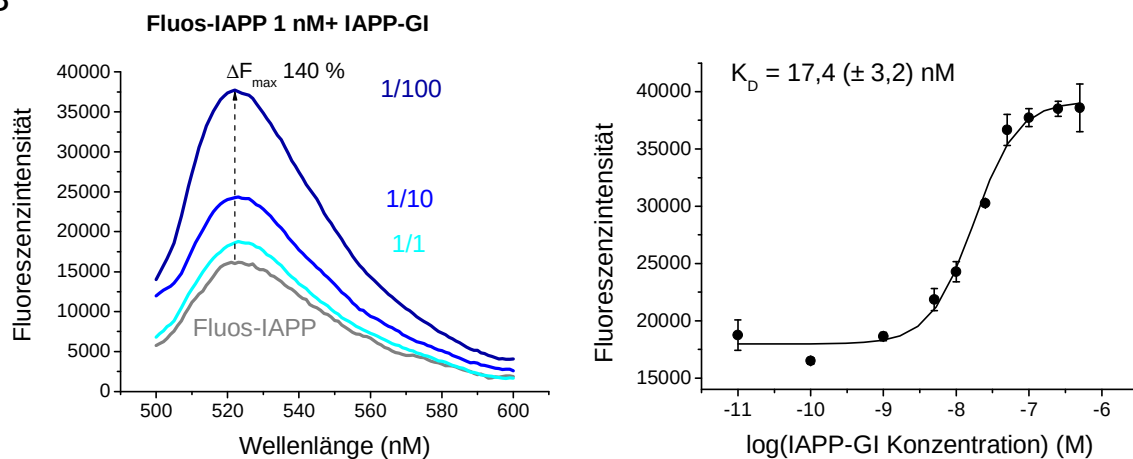
Bindung	Selbstassoziationskonstante ($K_D \pm$ SEM)
Fluos-IAPP + IAPP	9,7 ($\pm$ 0,9) nM
Fluos-IAPP-FA + IAPP-FA	59,5 ($\pm$ 8,3) nM
Fluos-IAPP-GI + IAPP-GI	3,5 ($\pm$ 1,7) nM
Fluos-IAPP-AL + IAPP-AL	27,4 ($\pm$ 3,5) nM
Fluos-IAPP-IL + IAPP-IL	13,8 ($\pm$ 2,9) nM
Fluos-rIAPP + rIAPP	3,6 ($\pm$ 0,7) nM

Im ersten Teil dieser Bindungsstudien wurde gezeigt, dass die IAPP-Analoga in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie IAPP selbstassoziiieren können. Als nächstes wurde untersucht, ob die Position der zwei N-methylierten Amidbindungen in der Sequenz der IAPP-Analoga (siehe Abbildung 1.15) einen Einfluss auf die Bindung an IAPP hat, und somit ausschlaggebend für die unterschiedlichen Effekte der Inhibitoren auf die IAPP-Aggregation sind. Für diese Versuchsreihe wurde N^α-aminoterminal Fluorescein-markiertes IAPP mit den Peptiden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP titriert. Um Fluos-IAPP in einem dissoziierten Zustand während der Interaktion mit den Analoga zu halten, wurde dessen Konzentration auf 1 nM gesetzt. In Abbildung 3.3 sind die Emissionsspektren (links) und die Bindungskurven (rechts) der einzelnen Titrationsen dargestellt. Alle Analoga binden an IAPP im niedrigen nanomolaren Bereich. Die aus drei Titrationskurven berechneten Dissoziationskonstanten (K_D) liegen zwischen 14-32 nM. Bei der Wechselwirkung von Fluos-IAPP mit IAPP-FA bzw. IAPP-GI wurden bei einem 100-fachen Überschuss der Analoga maximale Fluoreszenzänderungen bis zu 140 % erreicht. Die niedrigsten $\Delta F_{\max}$ wurden bei den Titrationsen mit IAPP-IL (70 %) und rIAPP (64 %) gemessen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Analoga mit bereits aggregiertem IAPP (Fluos-IAPP 10 nM) wechselwirken können. Hier wurde eine Titration nur mit dem effektivsten Inhibitor IAPP-GI durchgeführt. In Abbildung 3.3 F sind die Emissionsspektren und die Bindungskurve zu sehen. Bereits bei einem 10-fachen Überschuss an IAPP-GI wurde eine maximale Fluoreszenzänderung von 328 % erreicht. Die Dissoziationskonstante der Heterokomplexe aus 10 nM Fluos-IAPP und IAPP-GI beträgt 9,6 nM.

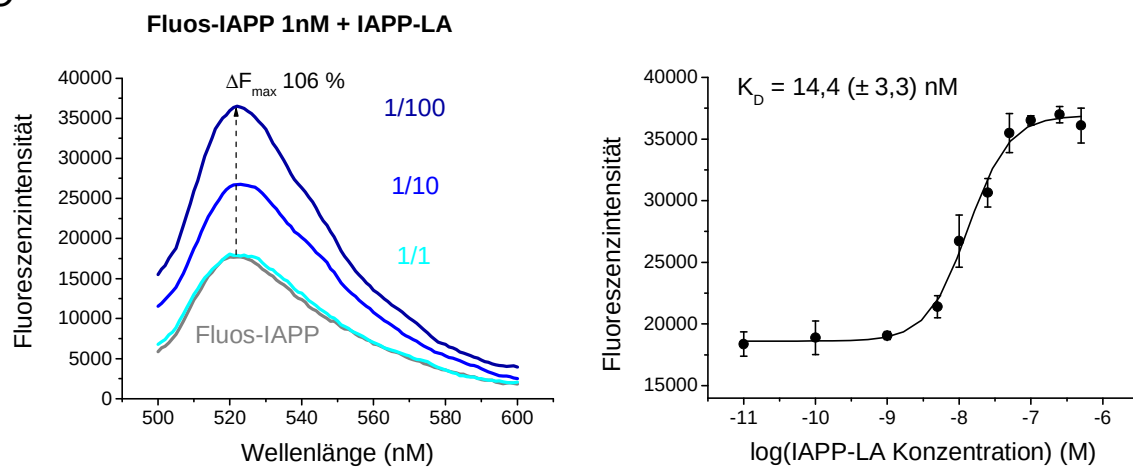
A



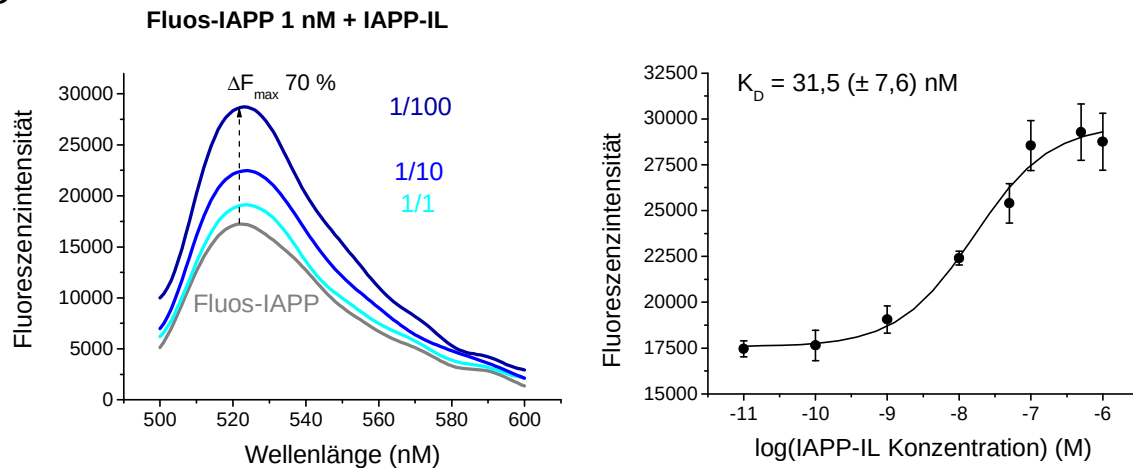
B



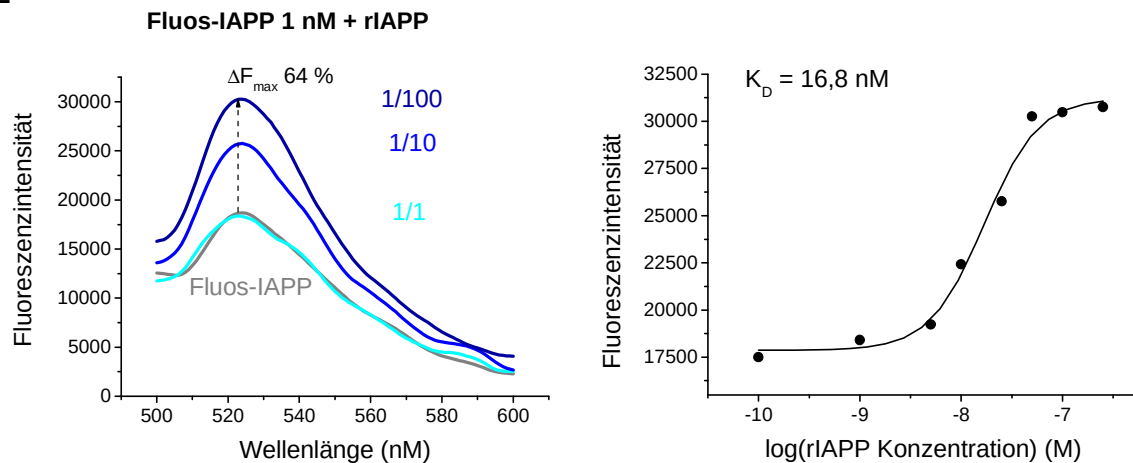
C



D



E



F

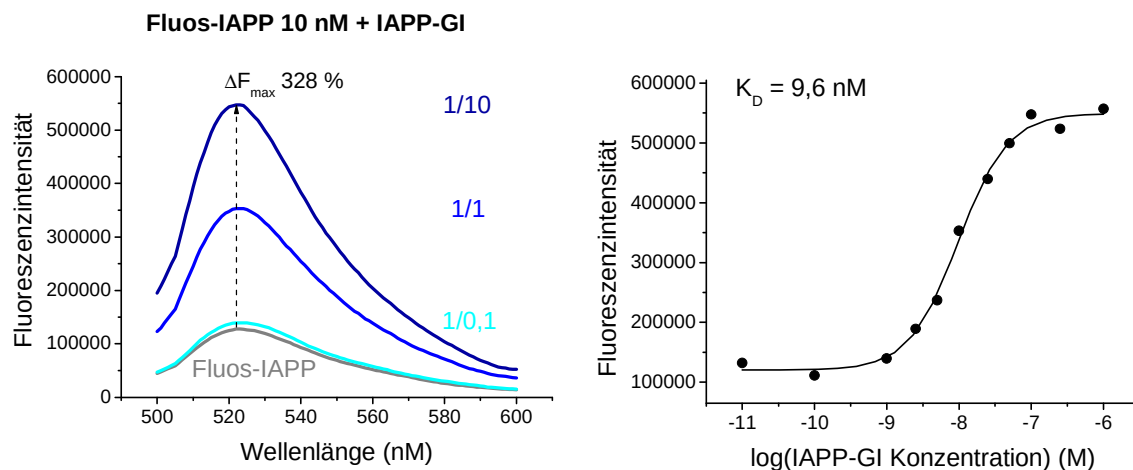
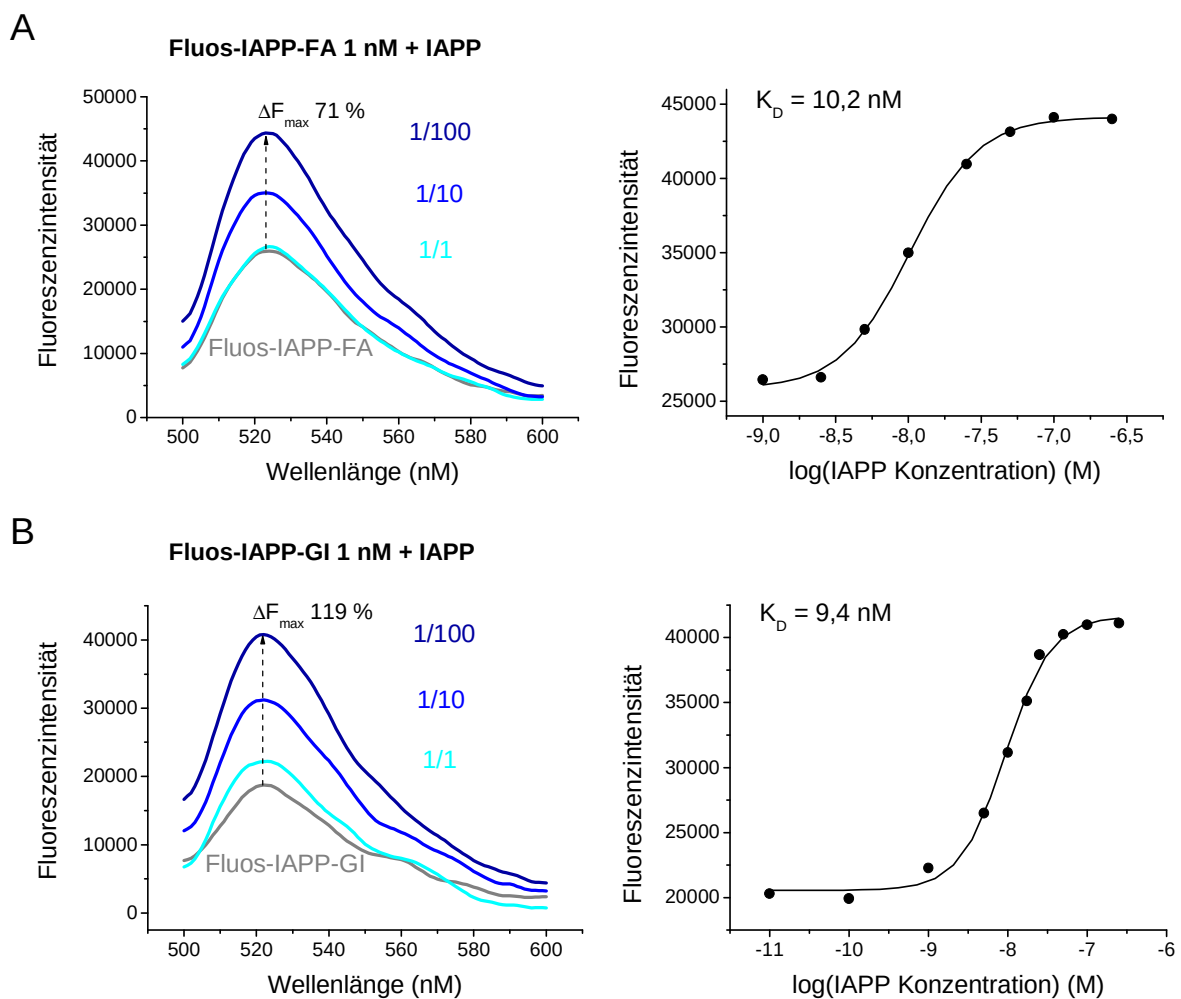


Abbildung 3.3: Heteroassoziation von Fluorescein-markiertem IAPP mit den Analoga.

Alle Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt. Anhand der Wechselwirkung der Peptide nahm die Fluoreszenzemission von Fluos-IAPP bei steigender Konzentration des Bindungspartners zu. Links sind die Emissionsspektren (ohne Hintergrundsignal) der einzelnen Messreihen zu sehen. Hier sind zusätzlich die maximalen Fluoreszenzänderungen bei 522 nm angegeben. Die Titrations Fluos-IAPP 1 nM + Analogon wurden, außer mit rIAPP, dreimal durchgeführt.

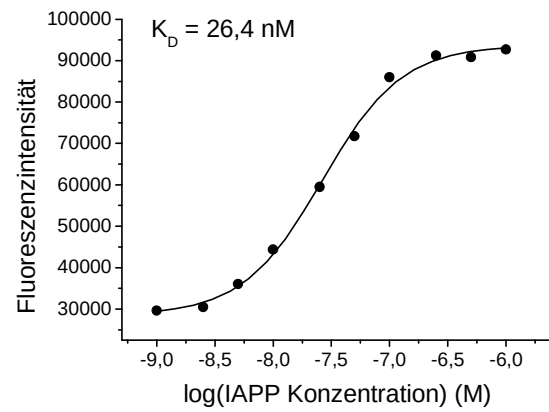
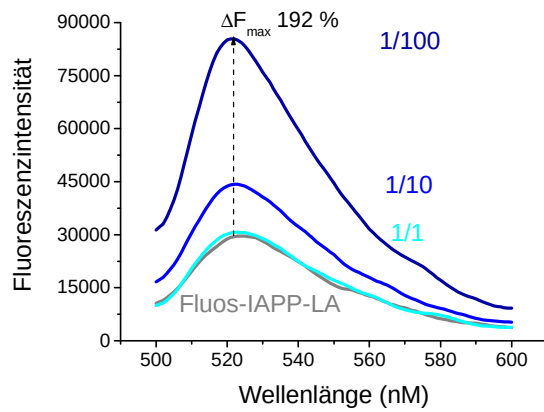
Aus den drei berechneten Dissoziationskonstanten wurde der Mittelwert ($\pm$ SEM) bestimmt. Die Bindung von IAPP-GI an selbstassoziiertem Fluos-IAPP (10 nM) wurde einmal untersucht.

Um den Einfluss der N-terminalen Markierung auf die Peptid/Peptid-Wechselwirkung zu untersuchen, wurden auch die IAPP-Analoga mit Fluorescein markiert und mit IAPP titriert (Abbildung 3.4). Die Dissoziationskonstanten, welche aus den Titrationskurven Fluos-IAPP 1 nM + Peptid und Fluos-Peptid 1 nM + IAPP berechnet wurden, unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die N-terminale Markierung der IAPP-Analoga keine signifikante Auswirkung auf ihre Interaktion mit IAPP hat. Eine Zusammenstellung der Dissoziationskonstanten ist in Tabelle 3.2 zu sehen. Die Bindung von IAPP an bereits selbstassoziiertem IAPP-GI (Fluos-IAPP-GI 10 nM) wurde ebenfalls untersucht. Anhand der Bindungskurve in Abbildung 3.4 E (rechts) ist zu sehen, dass IAPP an 10 nM Fluos-IAPP-GI binden kann. Die Dissoziationskonstante der Heterokomplexe ist jedoch fünfmal höher als bei der Titration von 1 nM Fluos-IAPP-GI mit IAPP.



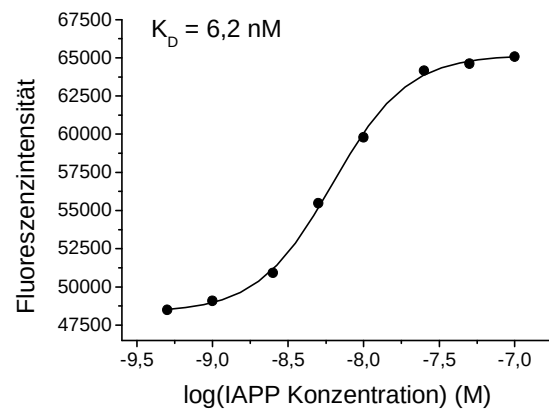
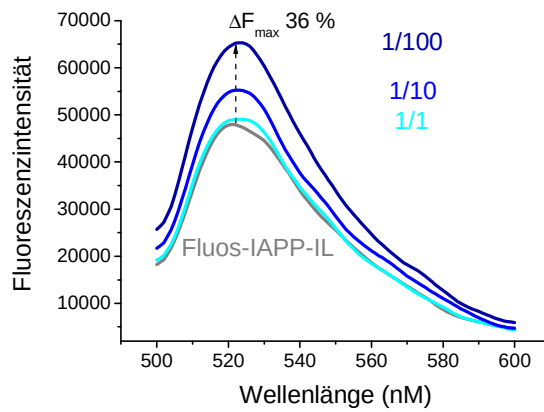
C

Fluos-IAPP-LA 1 nM + IAPP



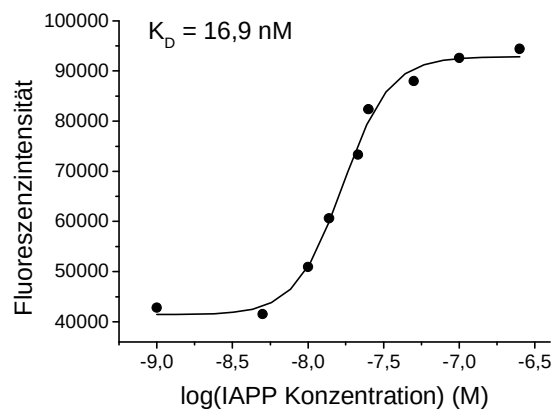
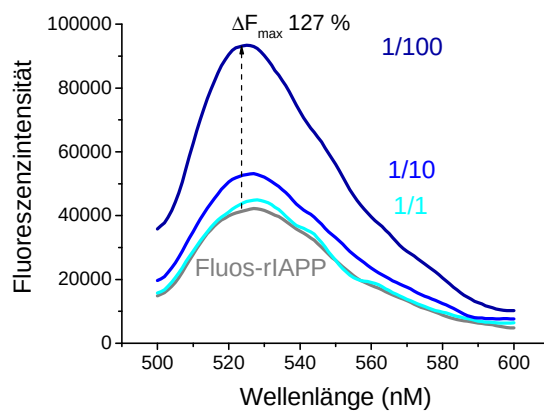
D

Fluos-IAPP-IL 1 nM + IAPP



E

Fluos-rIAPP 1 nM + IAPP



F

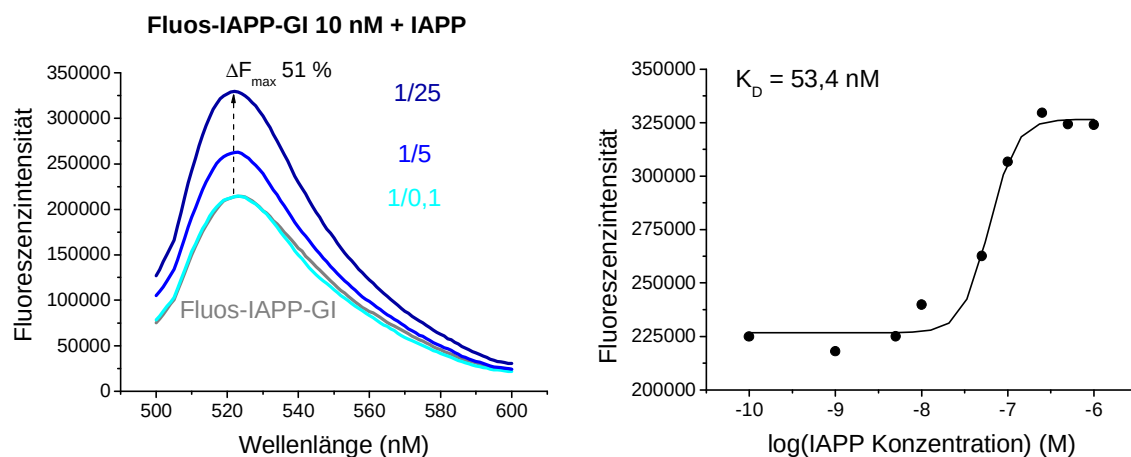


Abbildung 3.4: Wechselwirkung zwischen IAPP und den Fluorescein-markierten Analoga.

Links sind die Emissionsspektren (ohne Hintergrundsignal) und maximalen Fluoreszenzänderungen bei einem entsprechenden Überschuss an IAPP dargestellt. Die Messungen wurden mit einer Fluos-Peptid-Konzentration von 1 nM in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt (A-E). Die Interaktion von 10 nM Fluos-IAPP-GI mit IAPP ist unter F dargestellt. Alle Titrations wurden einmal durchgeführt und aus der Bindungskurve wurde die Dissoziationskonstante K_D berechnet (rechts).

Tabelle 3.2: Heteroassoziation von IAPP mit seinen Analoga und rIAPP: Vergleich der K_D .

Für diese Untersuchung wurden zwei Messreihen durchgeführt: Titration mit Fluos-IAPP (1nM) + Analogon ($n = 3$) und Fluos-Analogon (1 nM) + IAPP ($n = 1$). Alle Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt. Bei den Dreifachbestimmungen wurde zunächst für jede Bindungskurven die K_D bestimmt und daraus der Mittelwert ($\pm$ SEM) berechnet.

Fluos-IAPP + Analogon	Fluos-Analogon + IAPP
Fluos-IAPP + IAPP-FA $K_D = 21,4 (\pm 5,2) \text{ nM}$	Fluos-IAPP-FA + IAPP $K_D = 10,2 \text{ nM}$
Fluos-IAPP + IAPP-GI $K_D = 17,4 (\pm 3,2) \text{ nM}$	Fluos-IAPP-GI + IAPP $K_D = 9,4 \text{ nM}$
Fluos-IAPP + IAPP-AL $K_D = 14,4 (\pm 3,3) \text{ nM}$	Fluos-IAPP-AL + IAPP $K_D = 26,4 \text{ nM}$
Fluos-IAPP + IAPP-IL $K_D = 31,5 (\pm 7,6) \text{ nM}$	Fluos-IAPP-IL + IAPP $K_D = 6,2 \text{ nM}$
Fluos-IAPP + rIAPP $K_D = 16,8 \text{ nM}$	Fluos-rIAPP + hIAPP $K_D = 16,9 \text{ nM}$

3.2 Inhibierung der A β (1-40)-Aggregation zu zelltoxischen Spezies durch die Interaktion mit den IAPP-Analoga

3.2.1 Hemmung des durch A β (1-40) vermittelten Zelltods

Die Fähigkeit der IAPP-Analoga die Bildung von toxischen A β (1-40)-Aggregaten zu verhindern, wurde zuerst mithilfe des MTT-Reduktionsassays untersucht. Dieser Test beruht auf die Reduktion des Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch Zellen mit einem intakten Redoxpotential [253, 254]. Das gelbe MTT wird durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen zum blau-violetten Formazan umgesetzt, welches spektrophotometrisch gemessen werden kann. Die Abnahme der Mitochondrienfunktion geschädigter Zellen wird in diesem Assay durch eine verminderte MTT-Reduktion angezeigt.

Da IAPP-GI in den Studien mit IAPP am effektivsten dessen Selbstassoziation zu toxischen Spezies und Fibrillen unterdrücken konnte [97], wurde zunächst die Wirkung dieses IAPP-Analogon auf die zelltoxische A β (1-40)-Aggregation untersucht. Um die Ausbildung von toxischen Aggregaten zu fördern wurde A β (1-40) (10 μ M) und die Mischung A β (1-40)/IAPP-GI (1/1) zuerst bei 25 °C inkubiert. Nach 4 Tagen wurden die Lösungen mit Zellkulturmedium verdünnt und zu kultivierten Phäochromozytom-Zellen (PC-12) gegeben (finaler Peptid-Konzentrationsbereich: 750 bis 1 nM). Diese Tumorzelllinie wird in Kombination mit dem MTT-Reduktionsassay als System zur Untersuchung des neurodegenerativen Effekts des Amyloid- β -Proteins eingesetzt [254]. In Abbildung 3.5 A ist zu sehen, dass IAPP-GI in einem Verhältnis von 1/1 die A β (1-40)-Zytotoxizität blockieren konnte. Der Inhibitor selbst war für die PC-12 Zellen nicht toxisch. Zusätzlich wurde A β (1-40) mit verschiedenen Konzentrationen an IAPP-GI inkubiert. Der Effekt dieser Mischungen auf die PC-12-Zellvitalität ist in Abbildung 3.5 B dargestellt. Anhand der Titrationskurve wurde bei einer 100 nM A β (1-40)-Konzentration ein IC₅₀-Wert von 78 nM berechnet.

Desweiteren wurde gezeigt, dass IAPP-GI auch bei einer A β (1-40)-Konzentration von 100 μ M und einem molaren Verhältnis von 1/1 die zytotoxische Aggregation immer noch unterdrücken konnte (finale A β (1-40)-Konzentrationen von 1 μ M bis 1 nM; Abbildung 3.5 C). Das Kontrollpeptid rIAPP hatte keinen signifikanten Einfluss auf die A β (1-40)-Zytotoxizität; rIAPP selbst hatte keine zellschädigende Wirkung.

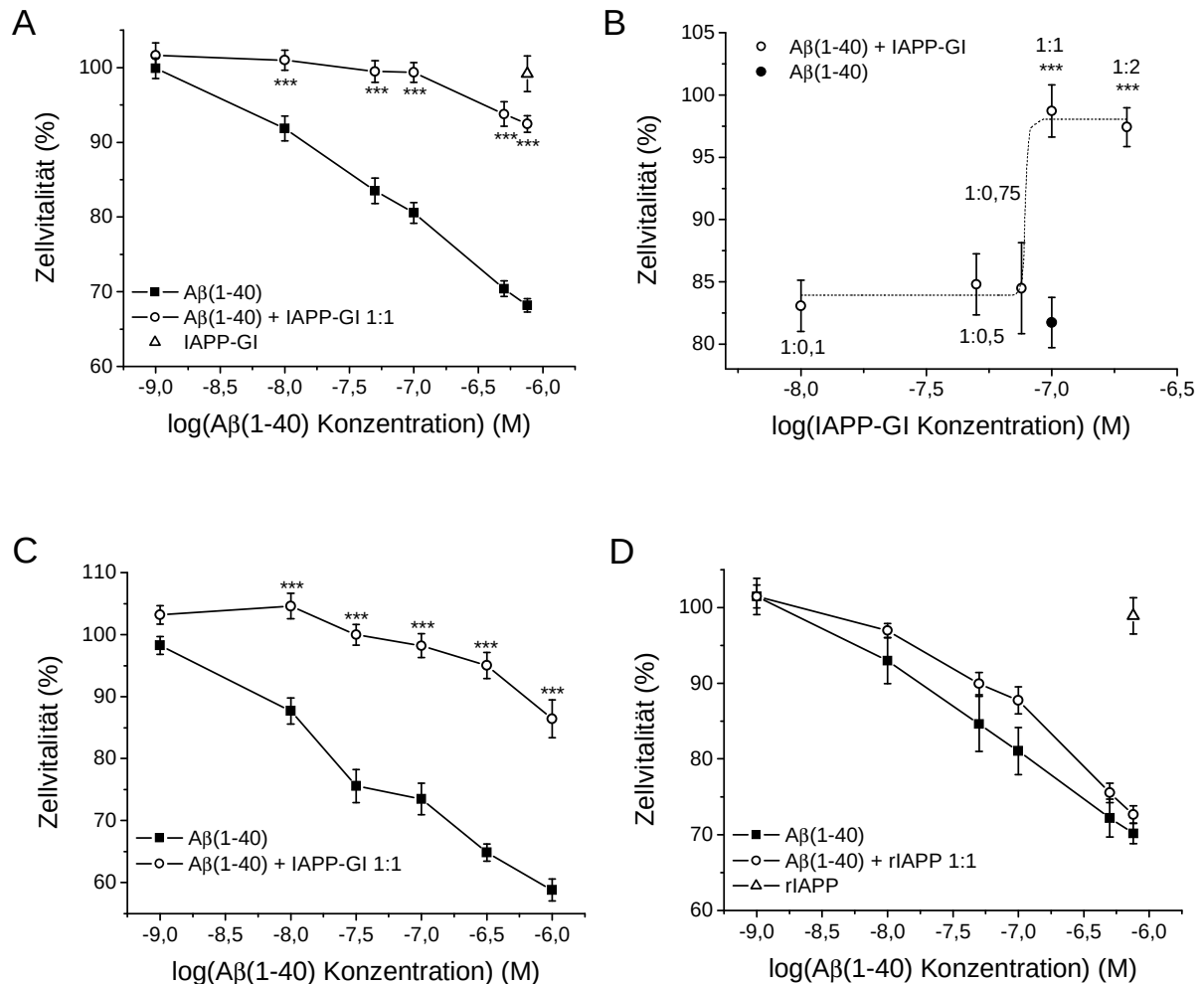
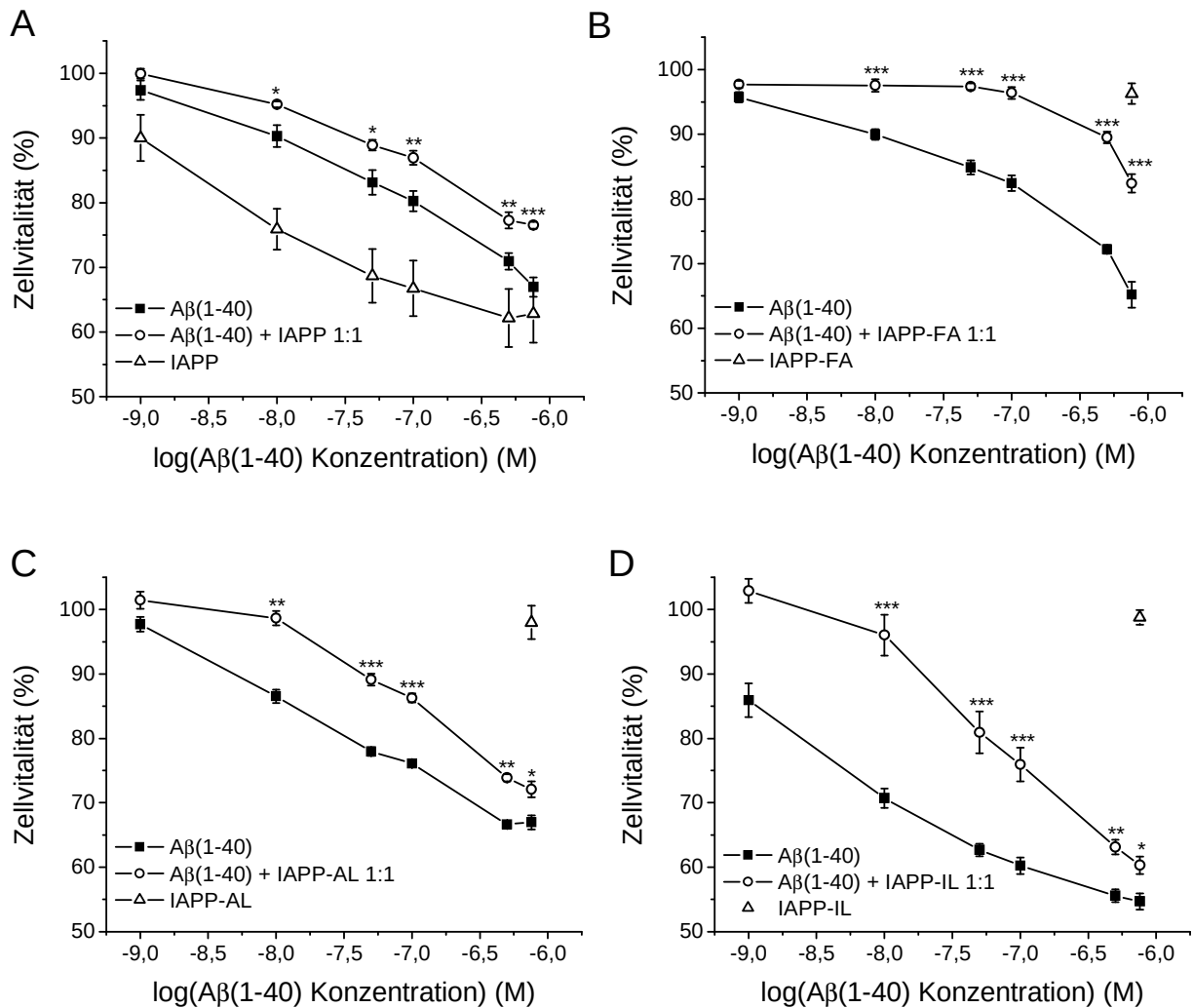


Abbildung 3.5: Inhibition der zytotoxischen Selbstassoziaton von Aβ(1-40) durch IAPP-GI.

(A) Zytotoxischer Effekt von 10 μM Aβ(1-40), 10 μM IAPP-GI und einer 1/1-Mischung (Inkubation in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,1 % HFIP, 4 Tage bei 25 °C) auf die Vitalität von PC-12 Zellen, gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays. Für alle Datenpunkte wurden drei Experimente in Dreifachbestimmung durchgeführt (* für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; mit ANOVA). (B) Bestimmung des IC₅₀-Wertes der Inhibition der Aβ(1-40)-Zytotoxizität auf PC-12-Zellen durch IAPP-GI. Hierfür wurde Aβ(1-40) 10 μM in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,1 % HFIP mit verschiedenen Mengen an IAPP-GI gemischt und 4 Tage bei 25 °C inkubiert. Der Effekt dieser Peptidlösungen auf die Vitalität der PC-12 Zellen wurde mittels der MTT-Reduktion bestimmt. Die finale Aβ(1-40)-Konzentration auf die Zellen beträgt 100 nM. Die Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 3 Assays (je $n = 3$); *** $p < 0,001$ mit ANOVA. (C) Unterdrückung der Aβ(1-40)-vermittelten Toxizität durch IAPP-GI bei einer 100 μM Aβ-Inkubationslösung (Aβ(1-40)/IAPP-GI-Mischung 1/1). Die Lösungen wurden in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 2,2 % HFIP für 4 Tage bei 25 °C inkubiert. Für alle Datenpunkte wurden drei Experimente in Dreifachbestimmung durchgeführt (*** für $p < 0,001$; mit ANOVA). (D) Einfluss des Kontrollpeptids rIAPP auf die zytotoxische Aβ(1-40)-Aggregation bei einer Aβ(1-40)-Konzentration von 10 μM und einem Mischungsverhältnis 1/1. Die Peptidlösungen wurden für 4 Tage bei 25 °C in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,1 % HFIP inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 3 Assays (je $n = 3$).

Da die Inhibitoren durch eine Modifikation der IAPP-Sequenz entstanden sind, wurde auch der Effekt von IAPP auf die zytotoxische Aβ(1-40)-Aggregation untersucht. In Abbildung 3.6 A ist zu sehen, dass unter diesen Versuchsbedingungen die Toxizität von IAPP deutlich

höher war als die von A β (1-40). Die Zelltoxizität der IAPP/A β (1-40)-Mischung (1/1) war dennoch geringer als die Toxizität der einzelnen Peptide. Diese Daten deuten daraufhin, dass beide amyloide Peptide ihre Aggregation zu toxischen Spezies gegenseitig blockieren können. Anhand dieser Ergebnisse ist zu sehen, dass vor allem A β (1-40) eine hohe inhibitorische Wirkung auf die IAPP-Toxizität hatte.



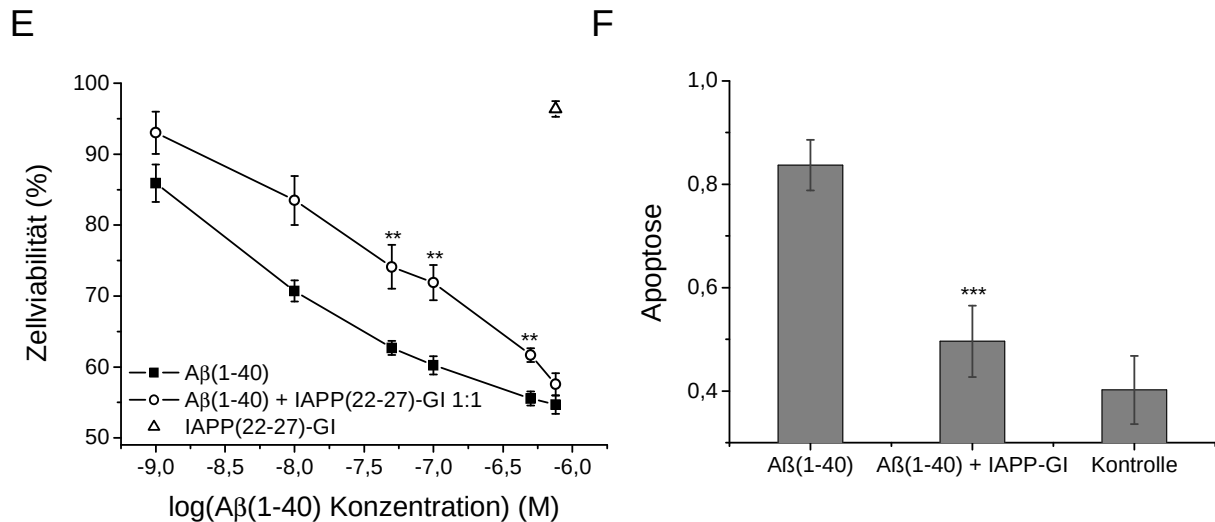


Abbildung 3.6: Effekt von IAPP und der IAPP-Analoga auf die Aβ(1-40)-Aggregation zu toxischen Spezies. Für diese Untersuchungen wurden Aβ(1-40), IAPP und die Analoga allein bei einer Konzentration von 10 μM und in Aβ(1-40)/Peptid-Mischungen (1/1) für 4 Tage bei 25 °C in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,1 % HFIP inkubiert. Der Effekt dieser Lösungen auf die Vitalität der PC-12 Zellen wurde mithilfe des MTT-Reduktionsassays und eines Apoptose-Quantifizierungs-Assays untersucht. MTT-Reduktionsassays: (A) Toxische Wirkung von Aβ(1-40), IAPP und der 1/1 Aβ(1-40)/IAPP-Mischung auf PC-12-Zellen. Für alle Datenpunkte wurden drei Experimente in Dreifachbestimmung durchgeführt (* für p<0,05; ** für p<0,01; *** für p<0,001; mit ANOVA). (B) Unterbindung der Aβ(1-40)-Toxizität durch IAPP-FA. Die Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 3 Assays (je n = 3). (C) Wirkung des IAPP-AL auf die zelltoxische Aβ(1-40)-Aggregation (Mittelwerte ± SEM aus 3 Assays; je n = 3). (D) Unterdrückung der Aβ(1-40)-Toxizität durch IAPP-IL (Mittelwerte ± SEM aus 3 Assays; je n = 3). (E) Unterbindung der toxischen Wirkung des Aβ(1-40) durch das N-methylierte IAPP-Fragment 22-27 (NFGAIL-GI). Die Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 3 Assays (je n=3). Apoptose-Assay: (F) Induktion von Apoptose durch 4 Tage bei 25 °C gealtertes Aβ(1-40) in PC-12 Zellen und dessen Inhibierung durch eine 1/1-Mischung mit IAPP-GI (100 μM Inkubationslösung in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 2,2 % HFIP; finale Konzentration auf Zellen: 1 μM). Der Assay wurde dreimal (je n=3) durchgeführt (***) für p<0,001; mit ANOVA).

Die anderen Analoga IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL waren wie IAPP-GI nicht toxisch, konnten jedoch die zytotoxische Aβ(1-40)-Aggregation nur teilweise inhibieren (Abbildung 3.6 B, C und D). Der Effekt von IAPP-GI wurde mit einem weiteren Inhibitor verglichen, der ähnlich wie IAPP-GI designt, aber im Gegensatz dazu nur aus einer IAPP-Amyloid-Kernsequenz, ein Hexapeptid, abgeleitet wurde (siehe Kapitel 1.3.2). Dieses modifizierte IAPP-Fragment 22-27 (siehe Abbildung 1.15 A) kann die Ausbildung von toxischen IAPP-Aggregaten ebenfalls inhibieren [94], jedoch wird durch IAPP-GI ein deutlich stärkerer Inhibitionseffekt erreicht [97]. Auch im Falle der Inhibition der Ausbildung zelltoxischer Aβ-Aggregate wurde gezeigt, dass die verkürzte IAPP-GI Sequenz nicht ausreichend ist, um die Aβ(1-40)-Amyloidtoxizität vollständig zu blockieren (Abbildung 3.6 E). Der Einfluss von NFGAIL-GI war vergleichbar mit dem Inhibitionsvermögen von IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL. NFGAIL-GI allein bildete keine toxischen Aggregate aus (Abbildung 3.6 E).

Es wurde bereits in anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass Aβ(1-40) den Zelltod durch Apoptose induzieren kann [255, 256]. Hier wurde mithilfe eines ELISAs die Entstehung von

Histon-assoziierten Nukleosomen gemessen, die ein Merkmal des apoptotischen Zelltods sind. Auch mit diesem Assay wurde die Eigenschaft von IAPP-GI, die Bildung von zelltoxischen A β (1-40)-Spezies zu unterdrücken, bestätigt (Abbildung 3.6 F).

3.2.2 Unterbindung der A β (1-40)-Fibrillenbildung durch IAPP-GI

Um zu untersuchen, ob IAPP-GI nicht nur die zelltoxische A β (1-40)-Aggregation, sondern auch die Ausbildung von fibrillären Strukturen inhibieren kann, wurden Aliquots der Inkubationen, welche für den MTT-Reduktionsassay verwendet wurden (siehe Kapitel 3.2.1), elektronenmikroskopisch untersucht. Abbildung 3.7 A zeigt A β (1-40)-Fibrillen und sphärische Aggregate, die nach einer 4-tägigen Inkubation bei 25 °C gebildet wurden. Die gealterte A β (1-40)/IAPP-GI-Mischung bestand dagegen hauptsächlich aus sphärischen Oligomeren (Abbildung 3.7 B). Als Kontrolle wurden auch A β (1-40)/IAPP-Mischungen untersucht. Diese bestanden hauptsächlich aus Fibrillen, wobei auch ein signifikanter Teil an Oligomeren gebildet wurde (Abbildung 3.7 D u. E). IAPP aggregierte nach 4 Tagen bei 25 °C zu fibrillären Strukturen (Abbildung 3.7 C). Anhand dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass IAPP-GI im Gegensatz zu IAPP die A β (1-40)-Fibrillenbildung blockieren kann.

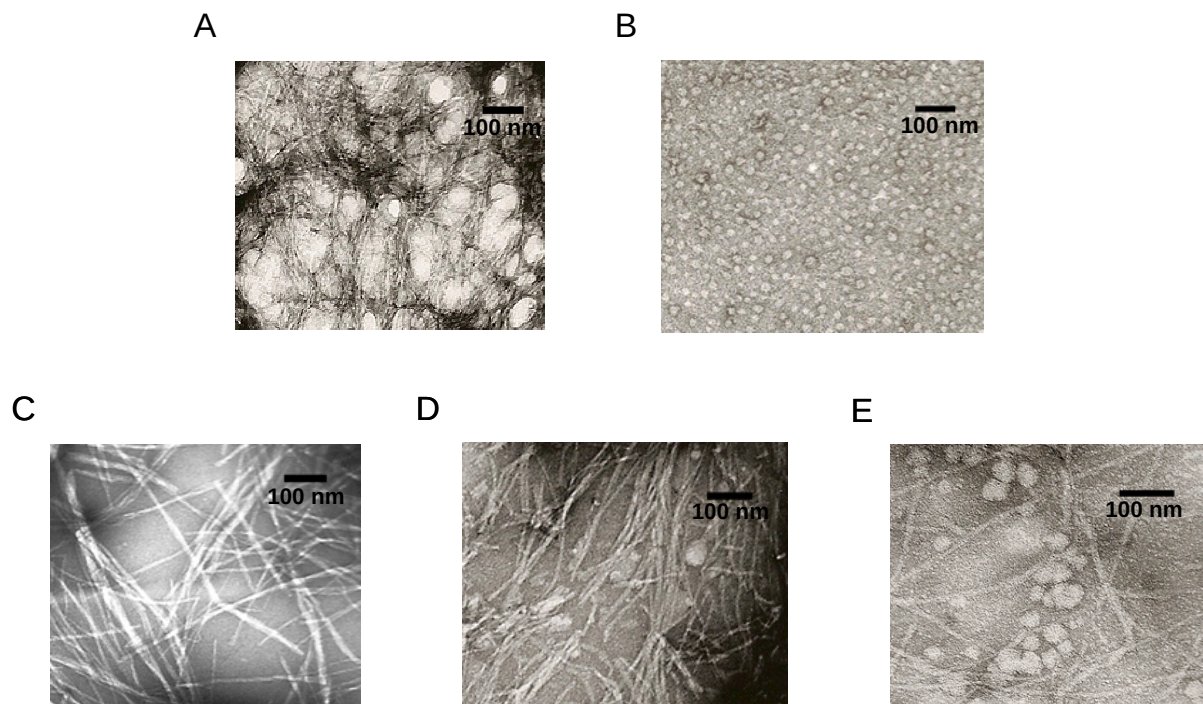


Abbildung 3.7: Inhibition der Fibrillogenese von A β (1-40) durch IAPP-GI (A, B) und Vergleich mit dem Effekt von IAPP (C-E). Elektronenmikroskopische Aufnahmen gealterter Lösungen von A β (1-40) (A), einer 1/1 A β (1-40)/IAPP-GI-Mischung (B), IAPP (C) und einer A β (1-40)/IAPP-Mischung (D, E). Die 4 Tage inkubierten Lösungen (10 μ M in 100 mM Tris-Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,1 % HFIP bei 25 °C) wurden auch für die Untersuchung der zelltoxischen Wirkung auf PC-12 Zellen verwendet.

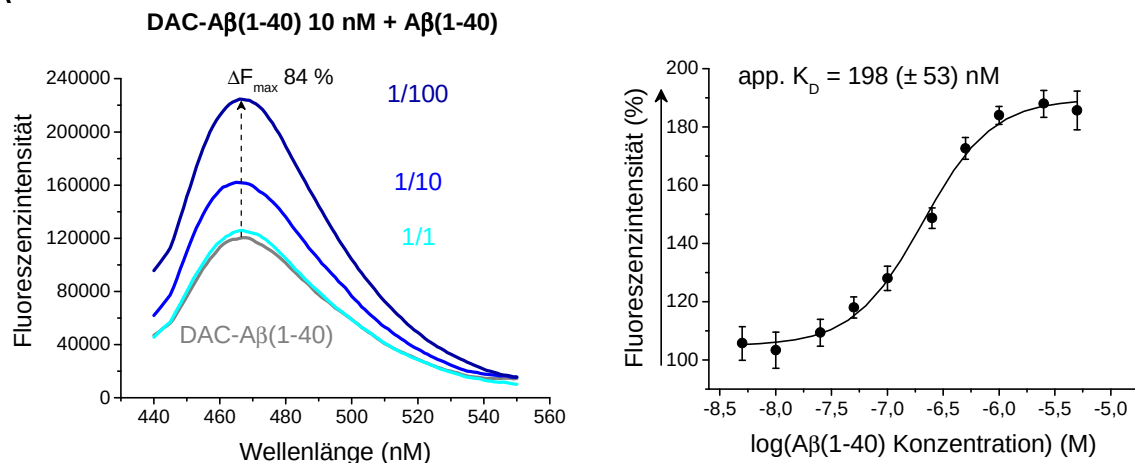
3.2.3 Charakterisierung der Selbstassoziation von A β (1-40) und Heteroassoziation mit den IAPP-Analoga

Der bereits unter 2.3 vorgestellte Fluoreszenz-Bindungsassay wurde auch hier durchgeführt, um zum einen die Selbstassoziation von A β (1-40) zu untersuchen und zum anderen die Interaktion von A β (1-40) mit den IAPP-Analoga zu charakterisieren. Für diese Studie wurde, kommerziell erhältliches und auch im Labor synthetisiertes, N $^{\alpha}$ -aminoterminal mit 7-Diethylaminocoumarin-3-Carbonyl markiertes A β (1-40) (DAC-A β (1-40)) verwendet. Befindet sich dieses Fluorophor DAC in einer hydrophoben Umgebung steigt seine Emission, bei Wechselwirkungen mit hydrophilen Interaktionspartnern sinkt sie dagegen ab [239]. DAC wird bei einer Wellenlänge von 430 nm angeregt. Die Emissionsspektren wurden zwischen 440 und 550 nm aufgenommen.

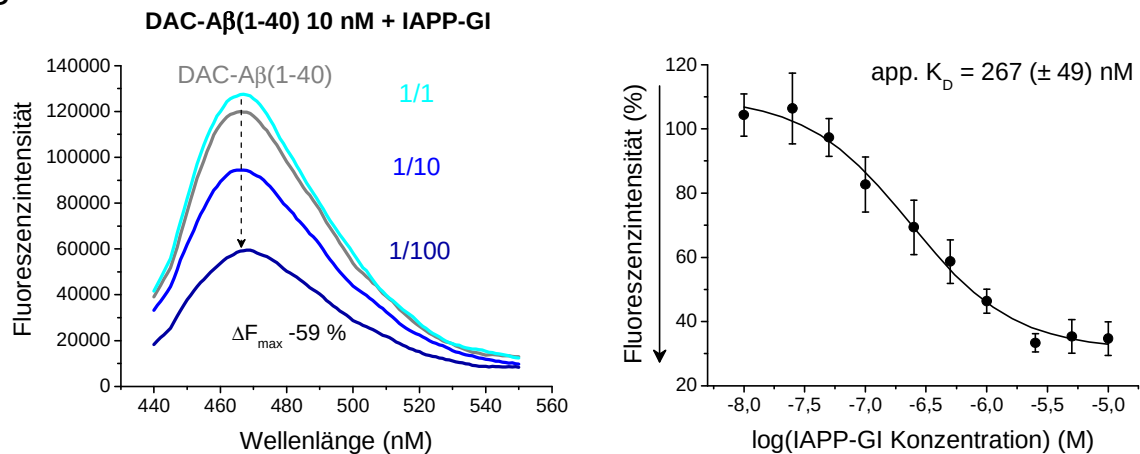
DAC-A β (1-40) wurde bei einer Konzentration von 10 nM mit A β (1-40), IAPP-GI und IAPP titriert. In Vorversuchen wurden Bindungsexperimente mit 1 nM DAC-A β (1-40) + A β (1-40) durchgeführt. Unabhängig von der A β (1-40)-Konzentration wurden höhere und niedrigere Fluoreszenzintensitäten, bezogen auf die Emission von DAC-A β (1-40) bei 1 nM, gemessen. Außerdem wurden nach der Messung der DAC-A β (1-40)/A β (1-40) Lösungen Präzipitate an der Küvettenwand beobachtet, die eine Messung verfälschen können. Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass diese Komplexe, welche durch 1 nM DAC-A β (1-40) und A β (1-40) gebildet werden, sehr instabil und hydrophob sind. Während der Messungen mit 10 nM DAC-A β (1-40) wurden mit steigender A β (1-40)-Konzentration höhere Emissionen des Fluorophors gemessen. Es wurden keine Präzipitate in der Lösung gebildet. Unklar ist jedoch, ob sich DAC-A β (1-40) bei 10 nM in einem monomeren oder selbstassoziierten Zustand befindet. Bei der Kurvenanpassung zur Berechnung der Dissoziationskonstante wird von einer 1/1-Interaktion der Bindungspartner ausgegangen (siehe Kapitel 2.5.2). Da anzunehmen ist, dass dies bei diesen Messungen eventuell nicht zutrifft, werden die Dissoziationskonstanten als „scheinbare“ (apparente) app. K_D angegeben.

Wie bereits erwähnt resultierte aus der Assoziation von DAC-A β (1-40) mit A β (1-40) eine höhere Emission des Fluorophors ($\Delta F \uparrow$, siehe Abbildung 3.8 A). Die Bindung von IAPP-GI bzw. IAPP an DAC-A β (1-40) führte dagegen zu niedrigeren Fluoreszenzintensitäten als die des markierten Amyloid- β -Peptids ($\Delta F \downarrow$, siehe Abbildung 3.8 B und C). Die app. K_D der gebildeten DAC-A β (1-40)/A β (1-40)-Komplexe wurde auf 198 nM berechnet. Die Ergebnisse der Bindungsstudie mit IAPP und IAPP-GI deuten darauf hin, dass diese Peptide an A β (1-40) binden und die Dissoziationskonstante der gebildeten Heterokomplexe sich im gleichen nanomolaren Bereich befinden, in der auch die A β (1-40)/A β (1-40)-Wechselwirkung stattfindet (DAC-A β (1-40)/IAPP app. K_D = 119 nM, DAC-A β (1-40)/IAPP-GI app. K_D = 267 nM).

A



B



C

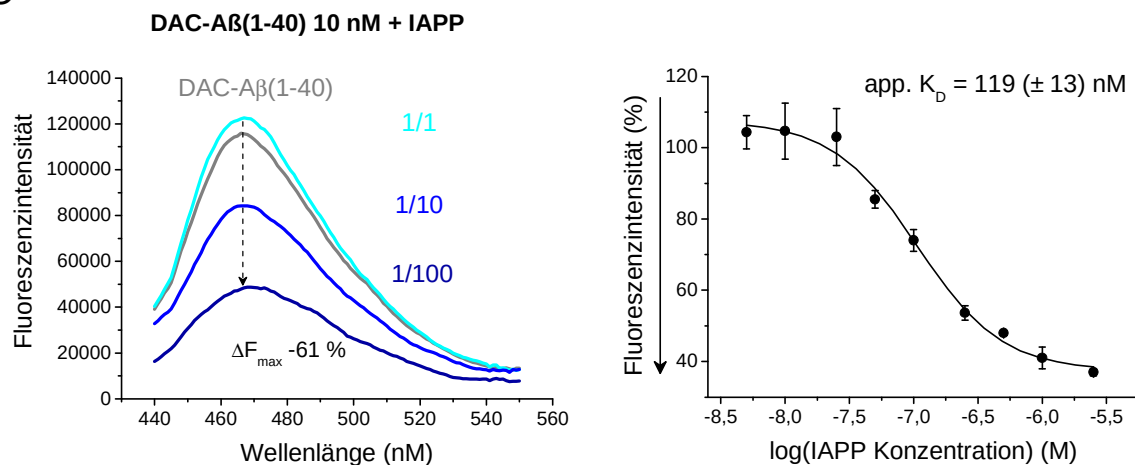
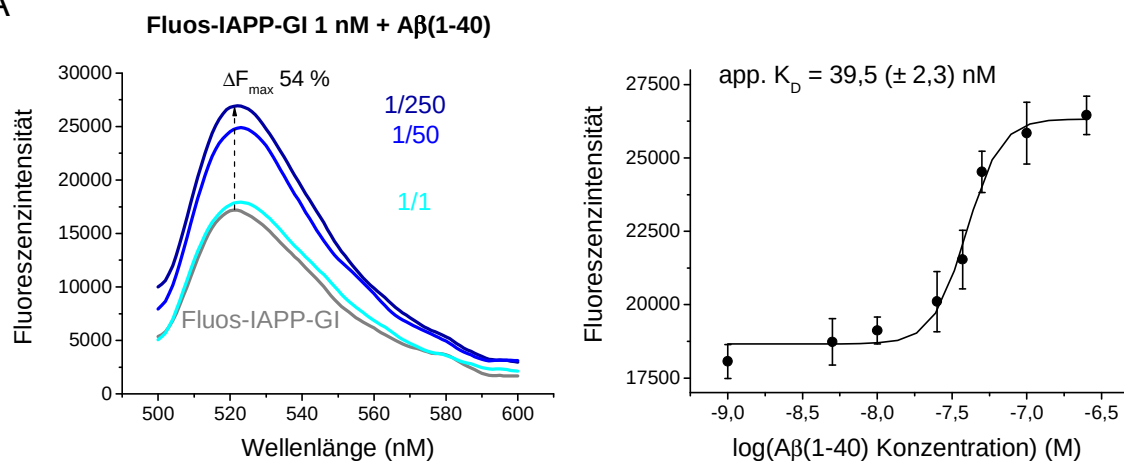


Abbildung 3.8: Untersuchung der Wechselwirkung von DAC-A β (1-40) mit A β (1-40), IAPP-GI und IAPP mittels Fluoreszenzspektroskopie. Die Bindungsstudien wurden mit 10 nM N $^{\alpha}$ -aminoterminal 7-Diethylaminocoumarin-3-Carbonyl-A β (1-40) (DAC-A β (1-40)) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 430 nm und die Aufnahme der Emissionsspektren zwischen 440 und 550 nm. Durch die Bindung von A β (1-40) an DAC-A β (1-40) wurden höhere Emissionen als die des DAC-A β (1-40) allein gemessen (A, links). Durch die Wechselwirkung von IAPP-GI bzw. IAPP mit DAC-A β (1-40) wurde die Emission des Fluorophors unterdrückt (B und C links). Von allen

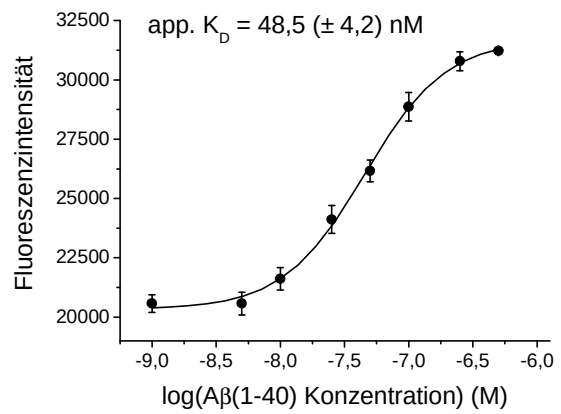
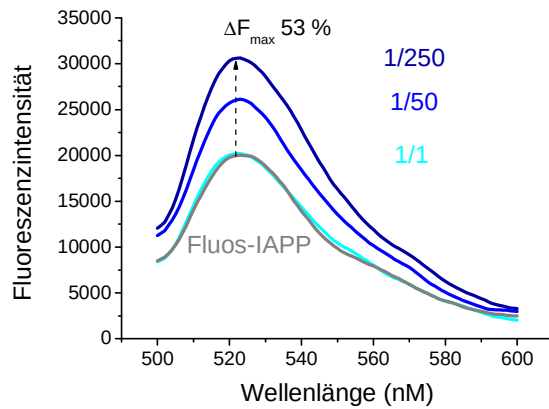
Emissionsspektren wurde das Hintergrundsignal des Puffers abgezogen. Die maximale Fluoreszenzänderung ist bei einem 100-fachen Überschuss an unmarkiertem Peptid angegeben. Anhand der Bindungskurven (rechts) wurden apparente Dissoziationskonstanten (app. K_D) berechnet (Mittelwert $\pm$ SEM aus $n = 3$ Messungen). Bei der Darstellung der Titrationskurven – Auftragung der gemessenen Fluoreszenzwerte bei 465 nm in Abhängigkeit von der Konzentration – wurde die Fluoreszenzintensität des DAC-A β (1-40) 10 nM auf 100 % gesetzt und alle anderen gemessenen Emissionen auf diesen Ausgangswert normiert: Fluoreszenzintensität $\times 100$ / Emission von DAC-A β (1-40) 10 nM.

Um den Einfluss der N-terminalen Markierung von A β (1-40) und des Assoziationsstatus von IAPP-GI und IAPP auf ihr Bindungsvermögen zu untersuchen, wurden Titrationsen mit N $^{\alpha}$ -aminoterminal Fluorescein-markiertem IAPP-GI (Fluos-IAPP-GI 1nM) bzw. IAPP (Fluos-IAPP 1 nM) und nicht-markiertem A β (1-40) durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass bei einer Konzentration von 1 nM sich Fluos-IAPP-GI bzw. Fluos-IAPP in einem monomeren Zustand befinden (siehe Kapitel 2.3). Die Peptid/Peptid-Wechselwirkungen führten zu einer Erhöhung der Emission des Fluorophors ($\Delta F_{\uparrow}$). Anhand der Titrationskurven wurde für die A β (1-40)/Fluos-IAPP-GI-Heteroassoziation eine app. K_D von 40 nM und für die A β (1-40)/Fluos-IAPP-Interaktion eine app. K_D von 49 nM berechnet (Abbildung 3.9 A und B). Durch die Messungen mit nicht-markiertem A β (1-40) wurden somit niedrigere Dissoziationskonstanten der A β (1-40)/Fluos-IAPP-GI- und A β (1-40)/Fluos-IAPP-Heterokomplexe erhalten (app. K_D der Titration Fluos-IAPP-GI + A β (1-40) um Faktor 7 und Fluos-IAPP + A β (1-40) um Faktor 2,5 niedriger) als bei denjenigen mit DAC-A β (1-40).

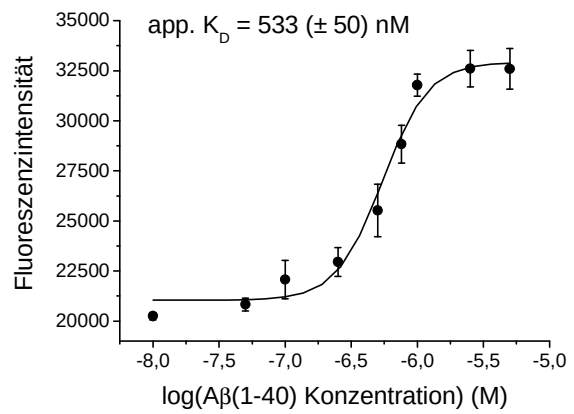
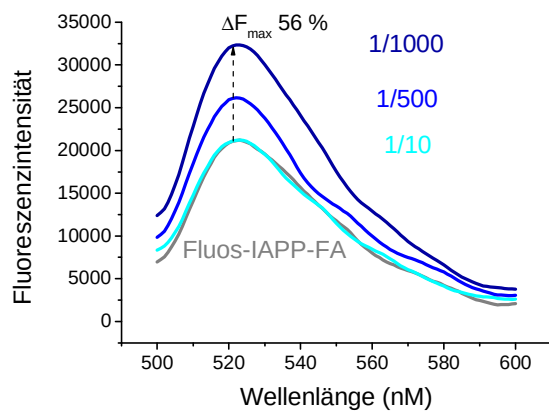
A



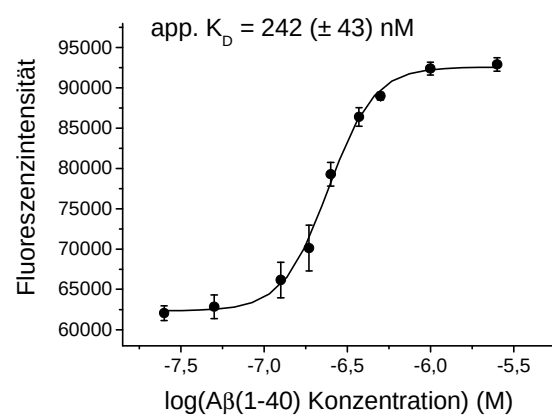
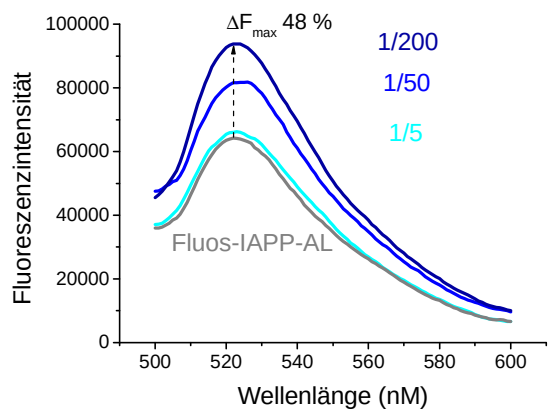
B

Fluos-IAPP 1 nM + A β (1-40)

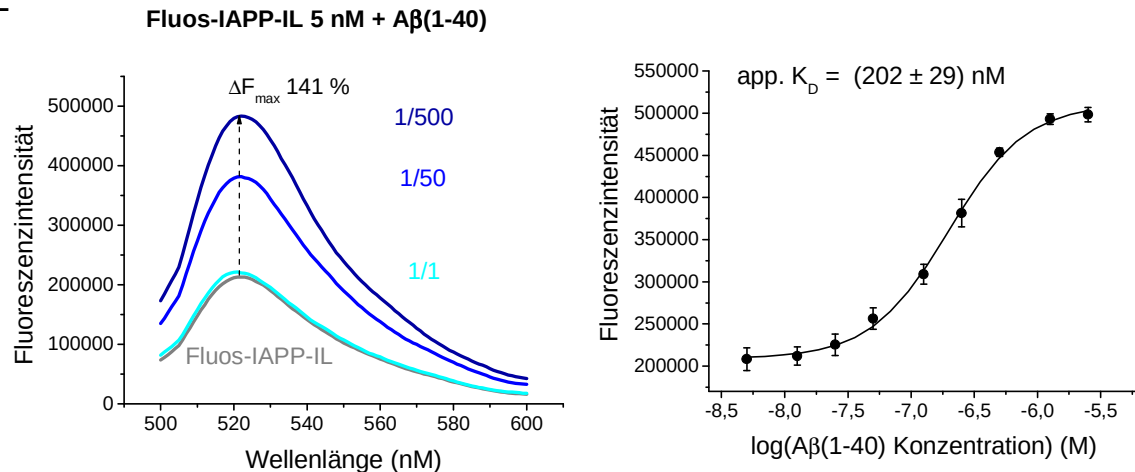
C

Fluos-IAPP-FA 1 nM + A β (1-40)

D

Fluos-IAPP-AL 5 nM + A β (1-40)

E



F

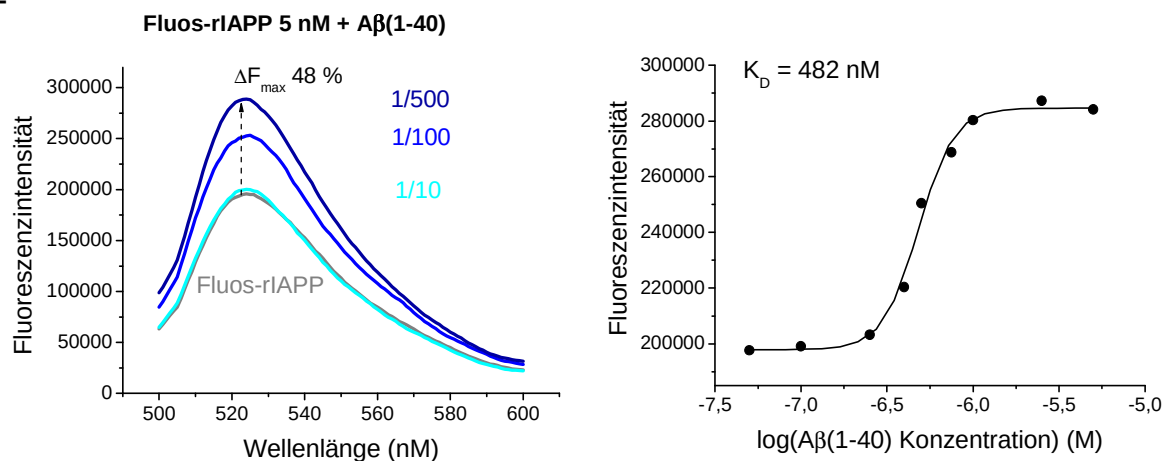


Abbildung 3.9: Heteroassoziation der IAPP-Analoga mit und rIAPP mit A β (1-40) gemessen mittels Fluoreszenzspektroskopie. Bei der Bindungsstudie von Fluos-IAPP-GI/A β (1-40) (A), Fluos-IAPP/A β (1-40) (B) und Fluos-IAPP-FA/A β (1-40) (C) betrug die Konzentration der Fluorescein-markierten Peptide 1 nM. Die Bindung von A β (1-40) an Fluos-IAPP-FA (D), Fluos-IAPP-IL (E) oder Fluos-rIAPP (F) wurde bei 5 nM untersucht. Alle Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 492 nm und die Aufnahme der Emissionsspektren zwischen 500 und 600 nm. Durch die Interaktion der Peptide erhöhte sich die Fluoreszenzintensität des Fluorophors. Links in der Abbildung sind die Emissionsspektren und die maximale Fluoreszenzerhöhung bei einem entsprechenden Überschuss an A β (1-40) dargestellt. Das Hintergrundsignal des Puffers wurde von allen Spektren abgezogen. Rechts sind die Bindungskurven und die daraus berechneten apparenten Dissoziationskonstanten (app. K_D) zu sehen (Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 3$ Messungen, außer Fluos-rIAPP + A β (1-40) aus $n = 1$).

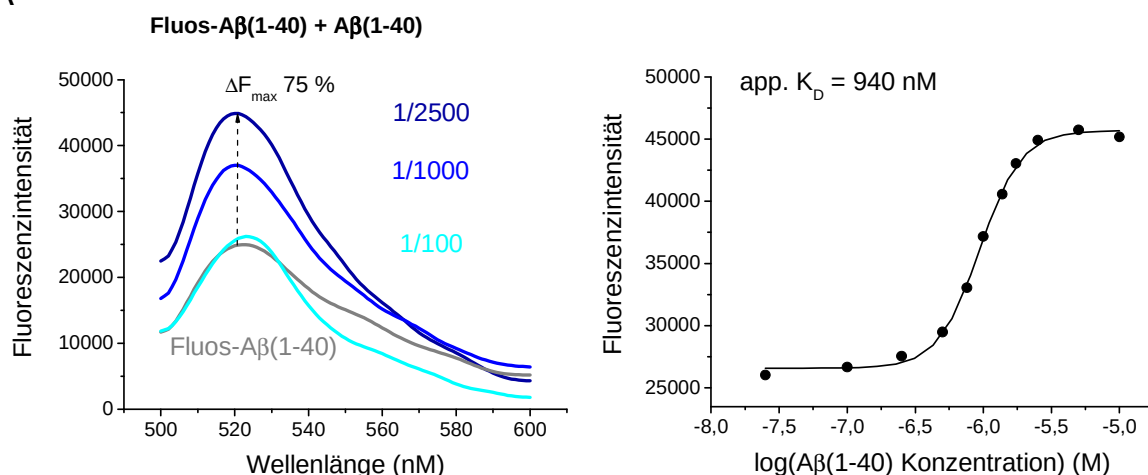
Die Wechselwirkung der anderen IAPP-Analoga mit A β (1-40) wurde ebenfalls untersucht. N $^{\alpha}$ -aminoterminal Fluorescein-markiertes IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL wurde mit A β (1-40) titriert. Allerdings konnte bei Fluos-IAPP-AL, Fluos-IAPP-IL und Fluos-rIAPP mit einer Konzentration von 1 nM und einem 1000-fachen Überschuss an A β (1-40) keine Fluoreszenzänderung des Fluoresceins gemessen werden. Erst durch eine Konzentrationserhöhung auf 5 nM der Fluorescein-markierten Peptide, wurde durch die Zugabe von

A β (1-40) Änderungen der Fluoreszenzintensität gemessen. Durch die Wechselwirkung der Peptide erhöhte sich die Emission des Fluoresceins ($\Delta F \uparrow$).

Mit einer app. K_D von 533 nM hatte Fluos-IAPP-FA am schlechtesten an A β (1-40) gebunden (Abbildung 3.9 C). Aus der Fluos-IAPP-LA/A β (1-40)- bzw. Fluos-IAPP-IL/A β (1-40)-Wechselwirkung resultieren Dissoziationskonstanten im Bereich von 200 nM (Abbildung 3.9 D, E). Keines dieser IAPP-Analoga konnte so gut mit A β (1-40) assoziieren wie IAPP-GI (app. K_D = 40 nM, siehe Abbildung 3.9 A). Das Kontrollpeptid rIAPP hatte an A β (1-40) mit einer app. K_D von 482 nM gebunden (Abbildung 3.9 F).

Wie bereits oben erwähnt, konnten aufgrund der Ausbildung instabiler und hydrophober Komplexe keine Titrations mit 1 nM DAC-A β (1-40) durchgeführt werden. Um festzustellen, ob IAPP-GI auch mit nicht-selbstassoziiertem A β (1-40) wechselwirken kann, wurde ein weiterer Versuch mit Fluorescein-markiertem A β (1-40) unternommen, welches anstatt in HFIP in DMSO vor der Titration gelöst wurde. Die Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % DMSO bei 25 °C durchgeführt. Durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für das Fluos-A β (1-40) konnten die Titrations problemlos durchgeführt werden. Abbildung 3.10 A zeigt, dass die Fluos-A β (1-40)/A β (1-40)-Komplexe mit einer K_D von 940 nM dissoziieren. Im Gegensatz dazu wies die Titration von DAC-A β (1-40) 10 nM mit A β (1-40) eine K_D von 198 nM auf (Abbildung 3.8 A). Die Wechselwirkung von IAPP-GI mit Fluos-A β (1-40) 1 nM (K_D 1160 nM) war deutlich schwächer als die mit DAC-A β (1-40) 10 nM (K_D 267 nM).

A



B

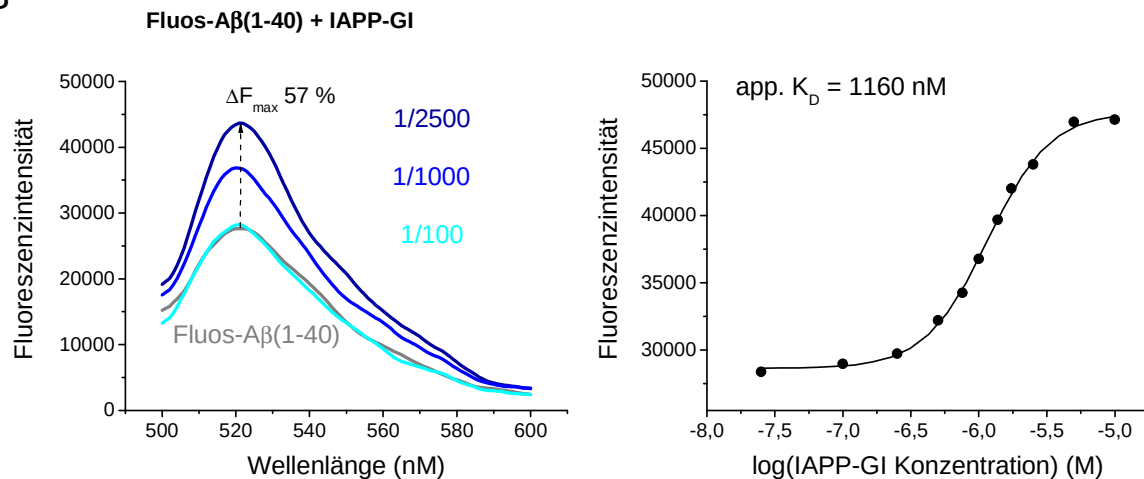


Abbildung 3.10: Selbstassoziation von A β (1-40) und Heteroassoziation mit IAPP-GI gemessen mittels Fluoreszenzspektroskopie und Fluorescein-markiertem A β (1-40). Bei der Bindungsstudie von Fluos-A β (1-40)/A β (1-40) (A) und Fluos-A β (1-40)/IAPP-GI (B) betrug die Konzentration des Fluorescein-markiertem A β (1-40) 1 nM. Die Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % DMSO bei 25 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 492 nm und die Aufnahme der Emissionsspektren zwischen 500 und 600 nm. Links in der Abbildung sind die Emissionsspektren und die maximale Fluoreszenzerhöhung bei einem entsprechenden Überschuss an A β (1-40) bzw. IAPP-GI dargestellt. Das Hintergrundsignal des Puffers wurde von allen Spektren abgezogen. Rechts sind die Bindungskurven und die daraus berechneten apparenten Dissoziationskonstanten (app. K_D) zu sehen. Die Messungen wurden jeweils einmal durchgeführt.

3.2.4 FRET-Messungen zur Untersuchung der A β (1-40)/IAPP-GI- bzw. A β (1-40)/IAPP-Interaktion

Anhand der unter Kapitel 3.2.3 dargestellten Bindungsstudien wurde gezeigt, dass sowohl IAPP-GI als auch IAPP mit A β (1-40) in einem nanomolaren Bereich wechselwirken kann. Durch diese Versuchsreihe konnte jedoch nicht die Frage beantwortet werden, weshalb IAPP-GI im Gegensatz zu IAPP die A β (1-40)-Aggregation zu toxischen Spezies vollständig inhibieren und die Fibrillenbildung unterbinden kann (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Daher wurde anhand von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen untersucht, ob es Unterschiede zwischen den Wechselwirkungen der beiden Peptide mit A β (1-40) gibt. Als FRET bezeichnet man die strahlungslose Energieübertragung von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf ein benachbartes zweites Fluorophor (Akzeptor). FRET kann nur entstehen, wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor kleiner als 100 Å ist und die Emissionsspektren der beiden Chromophore überlappen. Findet FRET statt, so werden eine geringere Fluoreszenz bei der Emissionswellenlänge des Donors und eine Erhöhung der Fluoreszenz des Akzeptors gemessen. Je näher sich die beiden Fluorophore befinden, desto größer sind die Emissionsänderungen des Donors ($\Delta F_{\downarrow}$) und Akzeptors ($\Delta F_{\uparrow}$).

Für die FRET-Messungen wurde DAC als Donor und Fluorescein als Akzeptor verwendet. Um eine Interaktion der Peptide zu ermöglichen, wurde die Konzentration für DAC-A β (1-40), Fluos-IAPP-GI und Fluos-IAPP auf 50 nM festgelegt. Kurz vor den Messungen wurden die markierten Peptide zunächst mittels HPLC gereinigt. Nach der Zugabe beider Peptide aus HFIP-Stammlösungen zum Natriumphosphatpuffer pH 7,4, wurde bei einer Anregung von 430 nm, innerhalb weniger Minuten das Emissionsspektrum zwischen 430 und 540 nm aufgenommen. Die Emissionsmaxima von DAC und Fluorescein befinden sich bei 465 nm bzw. 522 nm. Zuerst wurde der Energietransfer zwischen DAC-A β (1-40) und Fluos-IAPP-GI gemessen. In Abbildung 3.11 A sind die Emissionsspektren von drei Experimenten dargestellt. In dieser Versuchsreihe wurden zunächst die Peptide allein und danach die 1/1-Mischung gemessen. Um zu Vergleichen ob die Fluoreszenzabnahme des DAC und die Fluoreszenzzunahme des Fluosceins auf die A β (1-40)/IAPP-GI-Interaktion zurückzuführen ist, wurden die markierten Peptide mit dem jeweiligen unmarkierten Bindungspartner gemischt und ihre Emissionsspektren aufgenommen (DAC-A β (1-40) + IAPP-GI und Fluos-IAPP-GI + A β (1-40)).

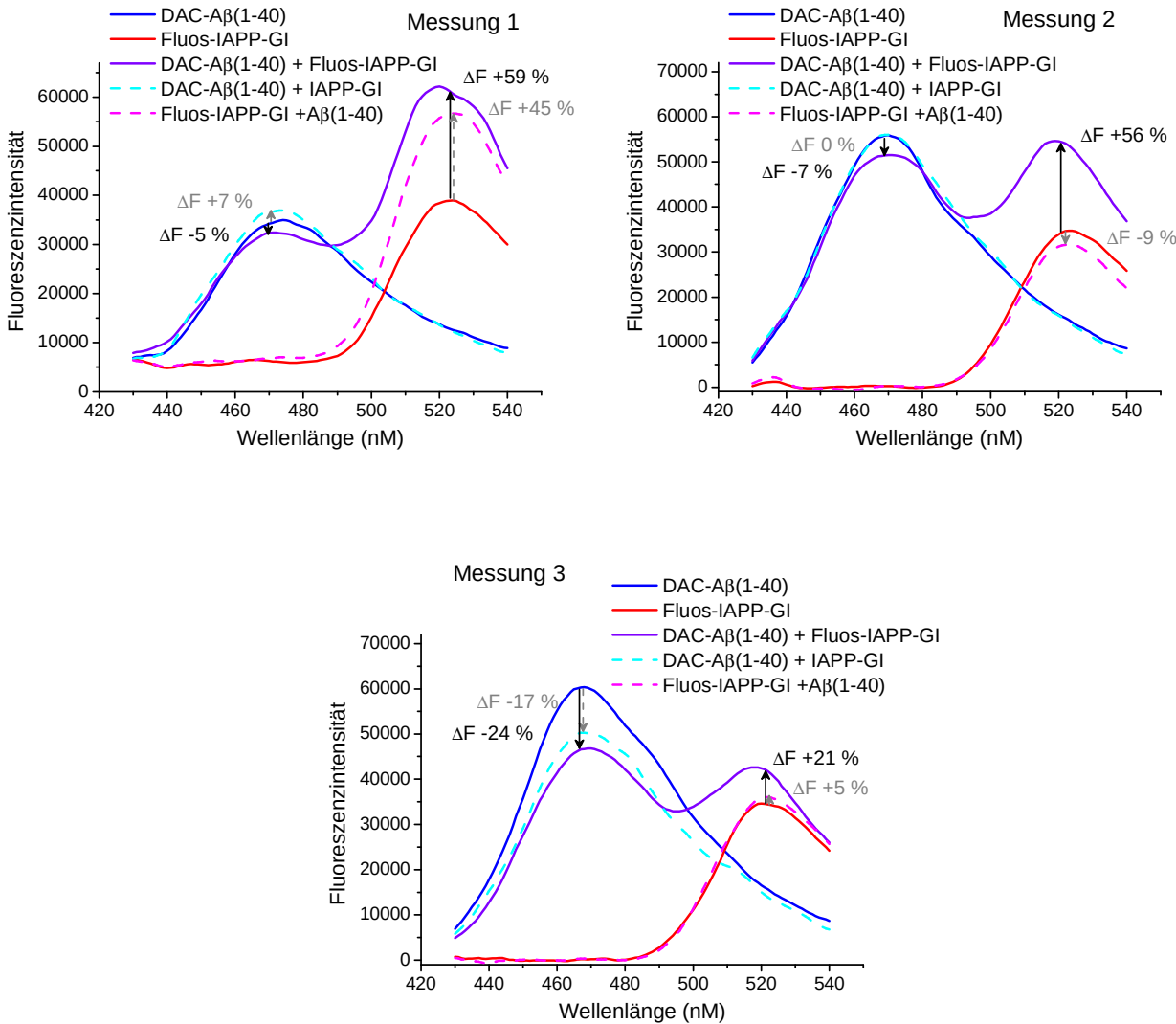
Bei allen drei Messungen konnte ein Energietransfer (Fluoreszenzabnahme bei 465 nm und -zunahme bei 522 nm) gemessen werden. Die Fluoreszenzänderungen entsprechen nicht den Werten der Kontrollmessungen (DAC-A β (1-40) + IAPP-GI und Fluos-IAPP-GI + A β (1-40)). Außerdem waren die Ergebnisse der Kontrollmessungen bei allen drei Messreihen unterschiedlich. Beispielsweise stieg bei der 1. Messung die Fluoreszenz des Fluos-IAPP-GI bei 522 nm durch die Zugabe von A β (1-40) um 59 % an. Bei der 2. Messung dagegen sank sie um 9 % ab, und bei der 3. Messung stieg sie nur um 5 % an.

Bei allen drei Messreihen der Mischung DAC-A β (1-40) + Fluos-IAPP fand ebenfalls ein Energietransfer statt (Abbildung 3.11 B) und die Fluoreszenzänderungen der Kontrollen (DAC-A β (1-40) + IAPP und Fluos-IAPP + A β (1-40)) unterschieden sich von den Fluoreszenzänderungen der Mischungen der FRET-Paare.

Diese Experimente deuten darauf hin, dass obwohl im Prinzip ein Energietransfer bei beiden Interaktionspaaren A β (1-40)/IAPP und A β (1-40)/IAPP-GI beobachtet wurde, detaillierte Untersuchungen notwendig sein werden, um die Interaktion der beiden Peptide mit A β (1-40) zu charakterisieren. Der Grund hierfür ist das komplizierte Selbstassoziationsprofil der jeweiligen Interaktionspartner.

A

FRET-Messung: DAC-A β (1-40) + Fluos-IAPP-GI



B

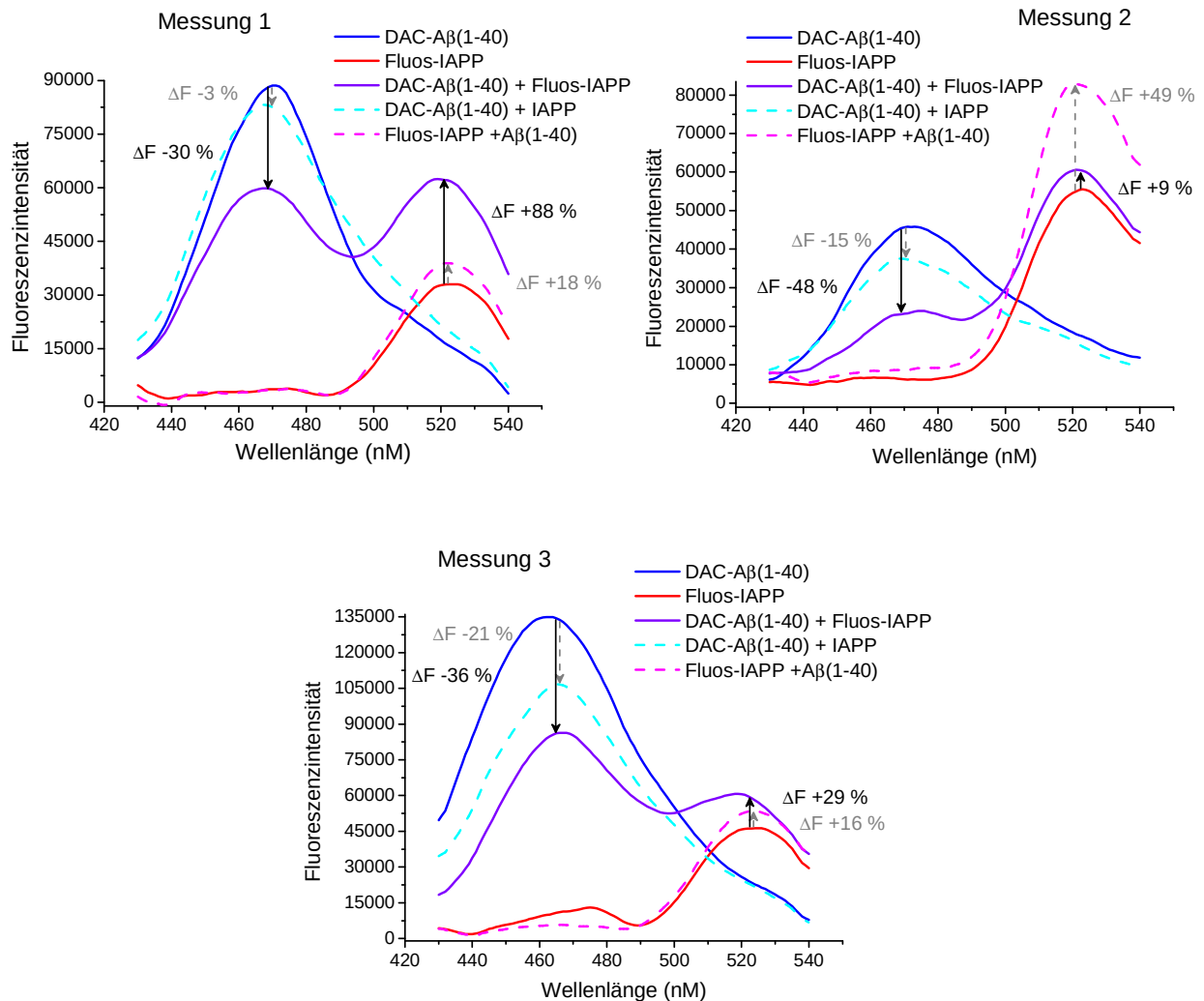
FRET-Messung: DAC-A β (1-40) + Fluos-IAPP

Abbildung 3.11: FRET-Messungen der Mischung DAC-A β (1-40) + Fluos-IAPP-GI bzw. Fluos-IAPP.

(A) Emissionsspektren (430-540 nm) von DAC-A β (1-40) 50 nM, Fluos-IAPP-GI 50 nM und der Mischungen DAC-A β (1-40) 50 nM + Fluos-IAPP-GI 50 nM, DAC-A β (1-40) 50 nM + IAPP-GI 50 nM und Fluos-IAPP-GI 50 nM + A β (1-40) 50 nM bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm. (B) Emissionsspektren (430-540 nm) von DAC-A β (1-40) 50 nM, Fluos-IAPP 50 nM und der Mischungen DAC-A β (1-40) 50 nM + Fluos-IAPP 50 nM, DAC-A β (1-40) 50 nM + IAPP 50 nM und Fluos-IAPP 50 nM + A β (1-40) 50 nM (Anregung bei 430 nm). Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Fluoreszenzabnahme bei 465 nm und -zunahme bei 522 nm nach der Energieübertragung angeregter DAC-Moleküle zu Fluorescein, ist in Prozent, bezogen auf die Fluoreszenzemission der markierte Peptide allein, angegeben. Die Fluoreszenzänderungen der Kontrollmessungen (markiertes + unmarkiertes Peptid) sind in grau dargestellt. Alle Messungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP bei 25 °C durchgeführt.

3.2.5 Nachweis der IAPP-GI/A β (1-40)-Interaktion unter Anwendung des Biotin-pull-down-Assays

Die Wechselwirkung der Peptide IAPP-GI und A β (1-40) wurde mit einem weiteren Assay untersucht. Hierfür wurde N ^{α} -aminoterminal biotinyliertes IAPP-GI (Biotin-IAPP-GI) mit frisch gelöstem A β (1-40) (Mischungsverhältnis 1/2) inkubiert. Vorversuche mit 1/1-Mischungen ergaben schwach detektierbare Banden. Durch die Verdopplung der A β (1-40)-Konzentration wurde die Ausbildung der Heterokomplexe begünstigt. Die gebildeten Biotin-IAPP-GI/A β (1-40)-Komplexe wurden über ihre spezifische Bindung an Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen aus der Lösung isoliert. Nach Ablösen der Komplexe von den Kügelchen (Erhitzen der Lösungen auf 95 °C) wurden eine NuPAGE-Elektrophorese und ein Western-Blot (WB) durchgeführt. Der Nachweis des Biotin-IAPP-GI erfolgte durch ein Streptavidin-POD-Konjugat. A β (1-40) wurde mittels einem anti-A β (1-40)-Antikörper detektiert. Als Kontrolle für die Detektion mit den Antikörpern wurde auf das Gel als „Input“ frisch gelöstes A β (1-40) und Biotin-IAPP-GI aufgetragen. Der anti-A β (1-40) Western-Blot in Abbildung 3.12 zeigt, dass an Biotin-IAPP-GI monomeres, dimeres und in geringen Mengen trimeres A β (1-40) gebunden hat. Die nicht-spezifische Bindung (NSB) von A β (1-40) an den Streptavidin-Kügelchen ist sehr gering. Freies und das an A β (1-40) gebundene Biotin-IAPP-GI konnte in diesem Assay-System mittels der Streptavidin-Kügelchen aus der Lösung isoliert und nach dem Western Blotting durch das Streptavidin-POD-Konjugat nachgewiesen werden (Abbildung 3.12 anti-Biotin WB).

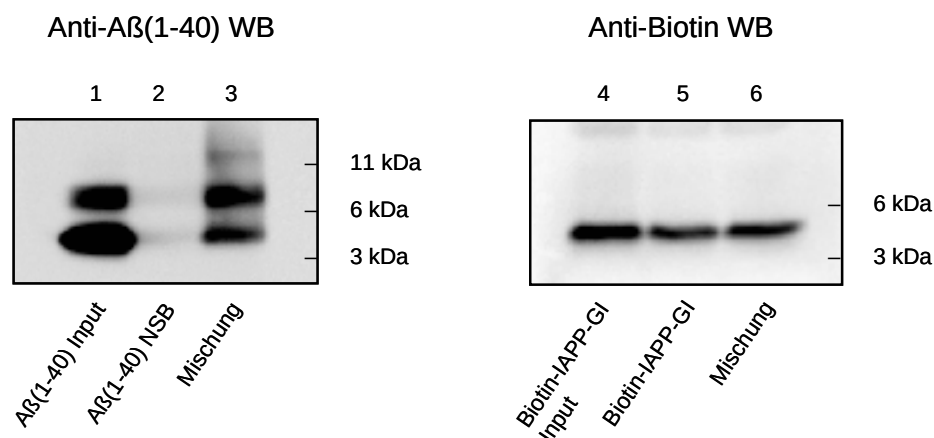


Abbildung 3.12: Biotin-pull-down-Assay zur Detektion der Bindung von IAPP-GI an A β (1-40).

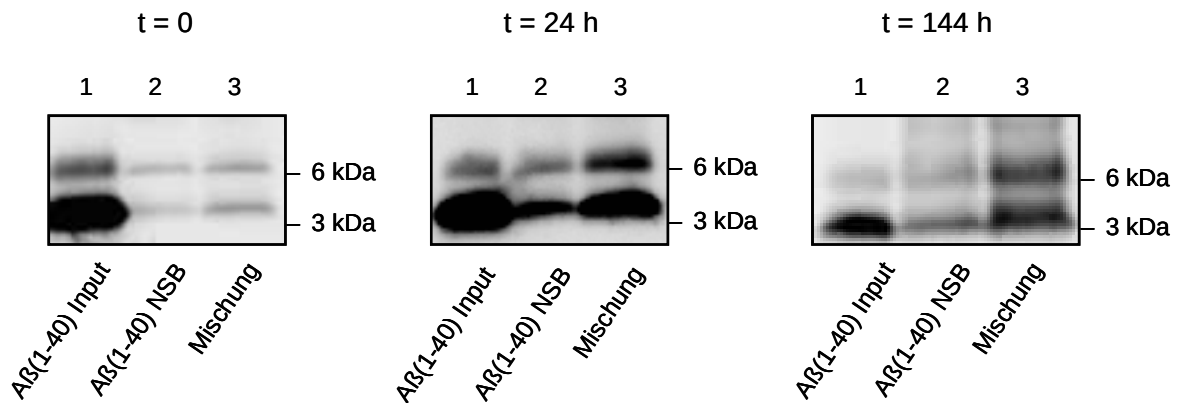
Nachweis der Heterokomplexe einer Biotin-IAPP-GI/A β (1-40)-Mischung (2,5 μ M/5 μ M) mittels Western-Blot. Zuvor wurde Biotin-IAPP-GI (2,5 μ M), A β (1-40) (5 μ M) und die 1/2-Mischung für 1 h in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C inkubiert. Mit A β (1-40) assoziiertes und freies Biotin-IAPP-GI wurde mittels der Bindung an Streptavidin-Kügelchen aus den Lösungen isoliert. Zum Abtrennung der Peptide von den Kügelchen wurden die Proben auf 95 °C erhitzt. Nach Auftrennung mittels SDS-Elektrophorese wurden die Peptide auf eine Membran geblottet und anhand eines Streptavidin-POD-Konjugats und anti-A β (1-40)-Antikörpers nachgewiesen. Links: Anti-A β (1-40) Westernblot (WB). (1) A β (1-40)-Input: frisch gelöstes A β (1-40) (1 μ g), ohne Inkubation mit Kügelchen, (2) A β (1-40)-NSB: nichtspezifische Bindung (NSB) von

A β (1-40) an Streptavidin-Kügelchen, (3) Biotin-IAPP-GI/Anti-A β (1-40)-Mischung (1/2), Inkubation mit Streptavidin-Kügelchen. Rechts: Anti-Biotin WB. (4) Biotin-IAPP-GI Input: 1 μ g frisch gelöst, ohne Streptavidin-Kügelchen. (5) Biotin-IAPP-GI allein und (6) Biotin-IAPP-GI/Anti-A β (1-40)-Mischung (1/2), Inkubation mit Streptavidin-Kügelchen. Die Western-Blots sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

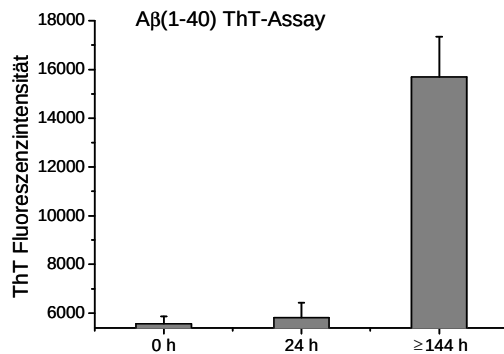
Des Weiteren wurde untersucht, ob IAPP-GI an aggregierte A β (1-40)-Spezies binden kann. Hierfür wurde A β (1-40) 16,5 μ M in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C inkubiert. Bei t = 0, t = 24 h und nach der Fibrillenbildung von A β (1-40) (144-288 h), wurde ein Teil der Lösung entnommen und mit Biotin-IAPP-GI für 1 h und danach mit Streptavidin-Kügelchen für eine weitere Stunde inkubiert. Nach Ablösen der A β (1-40)/Biotin-IAPP-GI-Komplexe von den Kügelchen wurden eine NuPAGE-Elektrophorese und ein Western-Blot (WB) durchgeführt. Der Nachweis von A β (1-40) erfolge mit Hilfe eines anti-A β (1-40)-Antikörpers, der gegen das ganze Peptid gerichtet ist (Abbildung 3.13 A). Fibrilläres A β (1-40) wurde in der Inkubationslösung durch den Thioflavin T (ThT)-Bindungsassay detektiert. Der Fluoreszenzfarbstoff ThT bindet selektiv an Fibrillen mit β -Faltblattstruktur. Durch die Wechselwirkung mit fibrillären Aggregaten steigt seine Fluoreszenzemission bei 482 nm an. In Abbildung 3.13 B ist zu sehen, dass nach 144 h A β (1-40) zu fibrillären Strukturen aggregiert ist. Die unter Abbildung 3.13 A dargestellten anti-A β (1-40) Western-Blots zeigen, dass Biotin-IAPP-GI sowohl an monomeres (t = 0) als auch an fibrilläres A β (1-40) (t = 144 h) binden kann. Auf dem Westen-Blot konnte nur mono- und dimeres A β (1-40) detektiert werden. Um die A β (1-40)/Biotin-IAPP-GI-Komplexe von den Kügelchen abzulösen und die Proben für die elektrophoretischen Trennung vorzubereiten, wurden die Lösungen auf 95 °C erhitzt und mit SDS versetzt. Dadurch können höhere Oligomere und fibrilläre A β (1-40)-Strukturen wieder aufgelöst werden.

Zur Bestimmung der gebunden Menge an A β (1-40) wurden die Banden (Monomer und Dimer) quantifiziert. Um die Ergebnisse der einzelnen Western-Blots miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst die Banden der nicht-spezifischen A β (1-40)-Bindung an den Streptavidin-Kügelchen von den Banden des A β (1-40), welches an Biotin-IAPP-GI gebunden hatte, abgezogen. Da die Blots mit unterschiedlichen Zeiten belichtet wurden, war eine Normierung der A β (1-40)-Banden auf die des A β (1-40)-Inputs notwendig (A β (1-40)/A β (1-40)-Input $\times$ 100). Die Quantifizierung der Banden (Abbildung 3.13 C) zeigt, dass die Menge an A β (1-40)-Mono- und Dimere, welche an Biotin-IAPP-GI gebunden hatten, in den für 144 h inkubierten A β (1-40)-Lösungen am höchsten ist.

A

Anti-A β (1-40) WB

B



C

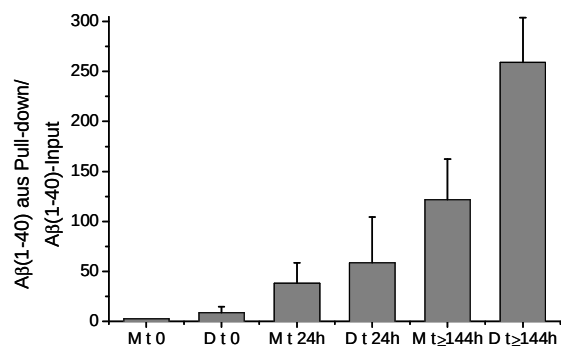


Abbildung 3.13: Wechselwirkung zwischen Biotin-IAPP-GI und aggregierten A β (1-40)-Spezies.

A β (1-40) (16,5 μ M) wurde in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden bei t=0, t=24 h und nach 144 oder 288 h 50 μ l Aliquots (3,6 μ g A β (1-40)) aus der Lösung entnommen und für den Pull-down mittels Biotin-IAPP-GI und zum Nachweis von A β (1-40)-Fibrillen verwendet. Nach dem Pull-down-Assay wurden die Proben mittels SDS-Elektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. A β (1-40) wurde mittels einem anti-A β (1-40)-Antikörper nachgewiesen (A) Anti-A β (1-40) Westernblot (WB): (1) A β (1-40)-Input: frisch gelöstes A β (1-40) (1 μ g), ohne Inkubation mit Kügelchen, (2) A β (1-40)-NSB: nichtspezifische Bindung (NSB) von A β (1-40) an Streptavidin-Kügelchen, (3) Biotin-IAPP-GI/Anti-A β (1-40)-Mischung. Die Western-Blots sind repräsentativ für n = 3 Experimente. (B) Nachweis von A β (1-40)-Fibrillen durch die spezifische Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T (ThT). Durch die Wechselwirkung mit Fibrillen steigt bei 482 nm die Fluoreszenzemission des ThT-Farbstoffs an. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus 3 Assays. (C) Die Intensität der A β (1-40)-Banden (Monomer [M] und Dimer [D]) wurde quantifiziert und auf die Bandenintensität des A β (1-40)-Inputs (Monomer und Dimer) normiert (A β (1-40)/A β (1-40)-Input $\times$ 100). Die Mittelwerte ($\pm$ SEM) wurde aus 3 Assays berechnet.

3.2.6 Stabilität der A β (1-40)/IAPP-GI- und A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe

In Kapitel 3.2.3 wurde gezeigt, dass IAPP-GI und IAPP an A β (1-40) binden können, und zwar in einem Konzentrationsbereich bei dem auch die Selbstassoziation dieser Peptide stattfindet. Trotz ähnlicher Affinität kann nur IAPP-GI die A β (1-40)-Aggregation zu toxischen Spezies vollständig blockieren (siehe Abbildung 3.5 A und Abbildung 3.6 A). Um diesen Unterschied näher zu untersuchen, wurde anhand von fluoreszenzspektroskopischen Messungen die Stabilität der A β (1-40)/IAPP-GI- und A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe untersucht. Um diese Komplexe zu bilden wurde Fluos-IAPP-GI oder Fluos-IAPP (1nM) mit einem 100-fachen Überschuss an A β (1-40) gemischt. Anhand der Fluoreszenz-Bindungsstudien (siehe Abbildung 3.9 A und B) ist bekannt, dass bei diesem Mischungsverhältnis alle Fluos-IAPP-GI- bzw. Fluos-IAPP-Moleküle mit A β (1-40) assoziiert sind. Die Fluoreszenzemission der Fluos-IAPP-GI/A β (1-40)- bzw. Fluos-IAPP/A β (1-40)-Heterokomplexe und der Fluorescein-markierten Peptide allein wurde danach über eine Zeitspanne von 20 Stunden bei 25 °C gemessen. Bei den Fluos-IAPP-GI- und Fluos-IAPP-Lösungen wurde keine Änderung der Emission beobachtet (Abbildung 3.14 A). Die Messungen der Fluos-IAPP-GI/A β (1-40)-Mischung (1/100) zeigten ebenfalls konstante Fluoreszenzwerte (Abbildung 3.14 B). Im Gegensatz dazu nahm die Emission der Fluos-IAPP/A β (1-40)-Lösung innerhalb von 4 bis 6 Stunden um ein Vierfaches ab. In Abbildung 3.14 B-E sind die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten bei 522 nm dargestellt. Die Fluoreszenz der markierten Peptide allein wurde abgezogen ($\Delta F = F_{\text{Komplex}} - F_{\text{Fluos-Peptid}}$).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzabnahme der Fluoresceinmarkierung in der Fluos-IAPP/A β (1-40)-Mischung von der Konzentration des A β (1-40) abhängig ist (Abbildung 3.14 C). Die Fluoreszenzemission der Heterokomplexe bei einem Verhältnis von 1/50 blieb stabil. Bei einem 200-fachen A β (1-40)-Überschuss nahm die Fluoreszenzintensität schneller ab als bei einem 100-fachen. Die 1/100-Mischung von Fluos-IAPP mit prä-aggregiertem A β (1-40) (Inkubation einer 100 nM A β (1-40)-Lösung für 20 h bei RT) hatte bereits bei $t = 0$ der Messung ein um das 2-fach niedrigere Signal als die Fluos-IAPP/A β (1-40)-Mischung (1/100) mit frisch gelöstem A β (1-40). Innerhalb von 4 Stunden sank dann die Fluoreszenz weiterhin ab und erreichte ein Plateau nach 6 Stunden. Dagegen hatte eine Erhöhung der A β (1-40)-Konzentration oder die Bindung an A β (1-40)-Oligomeren keinen Einfluss auf die Stabilität der Fluos-IAPP-GI/A β (1-40)-Heterokomplexe (Abbildung 3.14 D).

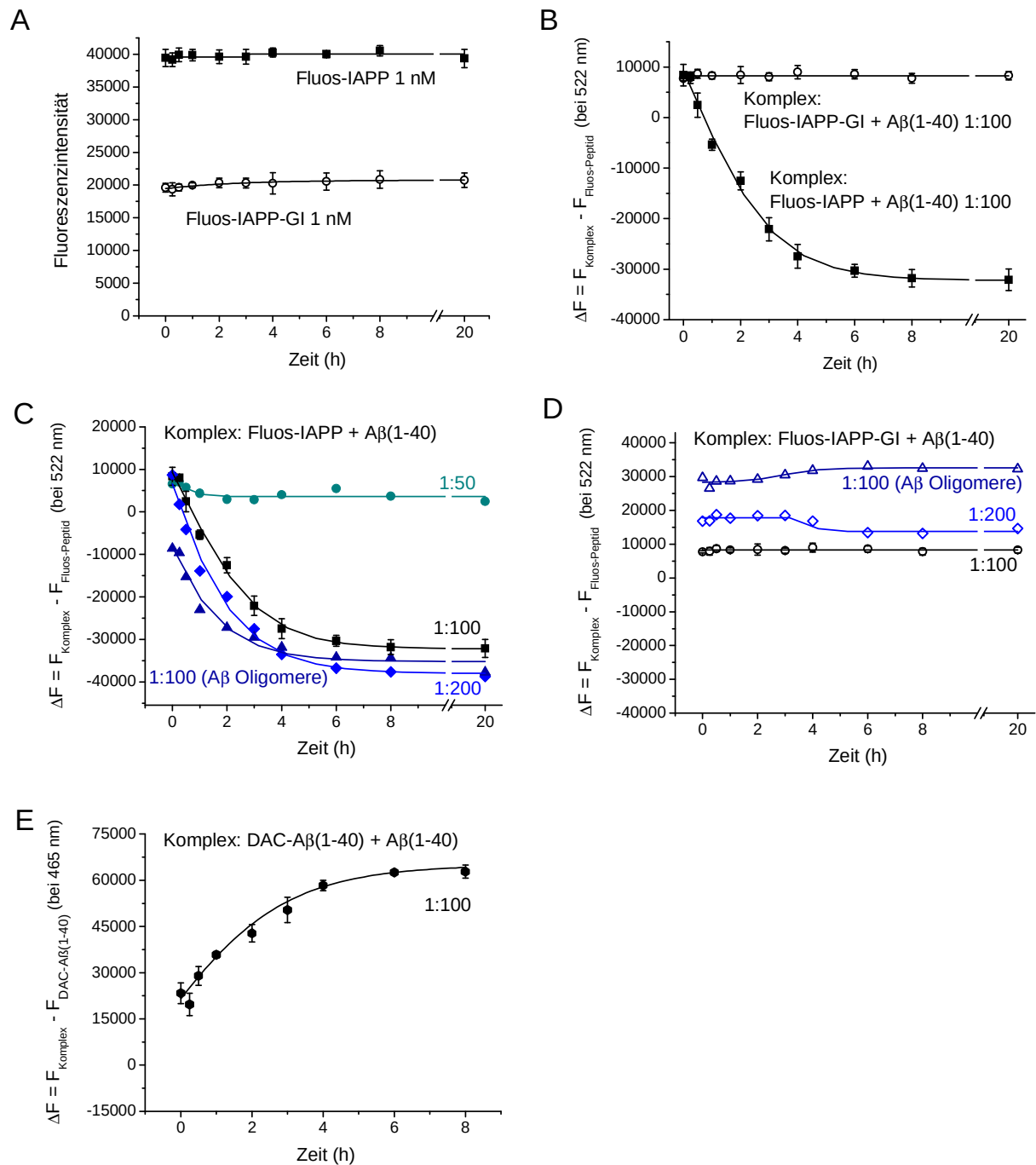


Abbildung 3.14: Stabilität der Fluos-IAPP-GI/A β (1-40)-, Fluos-IAPP/A β (1-40)- und DAC-A β (1-40)/A β (1-40)-Komplexe, gemessen mittels Fluoreszenzspektroskopie. Fluorescein-markiertes IAPP-GI (1 nM) bzw. IAPP (1 nM) wurde mit unterschiedlichen A β (1-40)-Konzentrationen (50 nM, 100 nM, 200 nM) oder aggregiertem A β (1-40) (100 nM A β (1-40)) inkubiert für 20 h bei 25 °C in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP gemischt. DAC-A β (1-40) 10 nM wurde mit 1 μ M A β (1-40) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP gemischt. In einer Zeitspanne von 20 Stunden bei 25 °C wurden Veränderungen der Emission bei 522 nm gemessen. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Intensitäten der Fluorescein-markierten Peptide allein (A) von den Mischungen abgezogen ($\Delta F = F_{\text{Komplex}} - F_{\text{Fluos-Peptid}}$). (B-D) Fluoreszenzänderung der Fluos-IAPP-GI/A β (1-40)- und Fluos-IAPP/A β (1-40)-Heterokomplexe in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwert $\pm$ SEM aus $n = 3$ Messungen). (E) Untersuchung zur Stabilität der DAC-A β (1-40)/A β (1-40)-Komplexe. Die Fluoreszenz des DAC-A β (1-40) 10 nM allein wurde von den Werten der 1/100-Mischung abgezogen ($\Delta F = F_{\text{Komplex}} - F_{\text{DAC-A}\beta(1-40)}$). Die Messungen wurden dreimal durchgeführt (Mittelwert $\pm$ SEM).

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission der DAC-A β (1-40)/A β (1-40)-Komplexe von der Zeit ist in Abbildung 3.14 E dargestellt. Durch die Interaktion von DAC-A β (1-40) (10 nM) mit A β (1-40) (1 μ M) wurde bereits bei $t = 0$ eine um 25 % erhöhte Fluoreszenz als bei DAC-A β (1-40) allein gemessen. Die Emission des Fluorophors erhöhte sich innerhalb 4 h um das 2-fache und blieb dann stabil. Die Ergebnisse dieser Versuchreihe zeigen, dass die Fluos-IAPP-GI/A β (1-40)-Heterokomplexe im Gegensatz zu den Komplexen aus Fluos-IAPP und A β (1-40) stabil sind. Diese Daten stimmen mit dem Befund überein, dass IAPP-GI, im Gegensatz zu IAPP, die A β (1-40)-Aggregation inhibieren kann.

Zusätzlich wurden Stabilitätsuntersuchungen der Heterokomplexe mit DAC-markiertem A β (1-40) und IAPP-GI bzw. IAPP durchgeführt. Dieses Fluorophor wurde bereits für die IAPP-GI/A β (1-40)- bzw. IAPP/A β (1-40)-Bindungsstudien verwendet (siehe Kapitel 3.2.3). Die Anregung erfolgt bei 430 nm. Seine Fluoreszenzemission wurde bei 465 nm gemessen. DAC-A β (1-40) allein (10 nM) ist unter diesen Versuchsbedingungen sehr instabil. Innerhalb von 30 Minuten fiel die Fluoreszenz um ca. 35 % ab (Abbildung 3.15 A). Danach blieb die gemessene Fluoreszenzemission von DAC-A β (1-40) konstant. IAPP-GI konnte an DAC-A β (1-40) binden, was zu einem Quenching des Fluorophors führte (siehe Abbildung 3.8 B und Abbildung 3.15 A). Der β -Amyloidinhibitor konnte bei einem 100-fachen Überschuss die Fluoreszenzemission des DAC-A β (1-40) innerhalb der Messdauer von 20 Stunden stabil halten (Abbildung 3.15 A). Da bei diesem Mischungsverhältnis alle DAC-A β (1-40)-Moleküle mit IAPP-GI assoziiert sind (siehe Abbildung 3.8 B), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die DAC-A β (1-40)/IAPP-GI-Heterokomplexe stabil sind. Bei der Auswertung wurde das Signal von DAC-A β (1-40) allein bei $t = 0$ als relative Fluoreszenz von 1,0 gesetzt. Alle weiteren Messpunkte wurden auf diesen Ausgangswert bezogen (bei 465 nm; $F_{\text{relativ}} = 1 \times F_{\text{DAC-A}\beta(1-40) t=0} / F$).

Die DAC-A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe waren dagegen äußerst instabil. Auch hier führte die Interaktion zwischen DAC-A β (1-40) und IAPP zunächst zu einem Signalabfall. Nach einer Stunde stieg jedoch die Fluoreszenz des Komplexes um ca. 40 % wieder an. In Abbildung 3.15 B ist zu sehen, dass die Instabilität der DAC-A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe von der IAPP-Konzentration abhängig war; je mehr IAPP-Moleküle in der Lösung vorhanden waren, desto schneller und stärker war die Veränderung der Fluoreszenz. Dagegen konnte IAPP-GI bei einem 50 bis 300-fachen Überschuss die Fluoreszenzemission von DAC-A β (1-40) stabil halten (Abbildung 3.15 C).

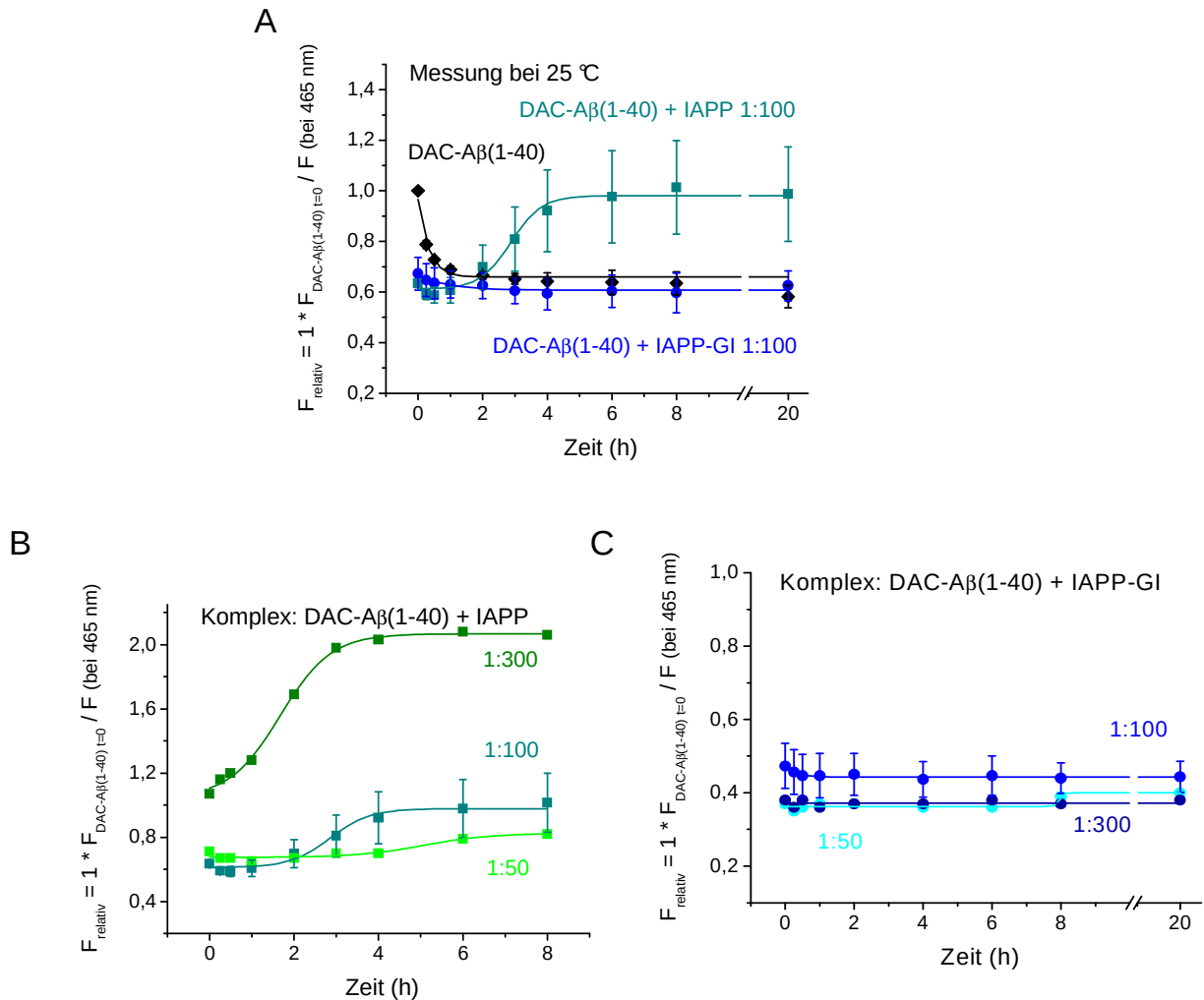


Abbildung 3.15: Stabilitätsuntersuchung der Heterokomplexe DAC-A β (1-40)/IAPP-GI und DAC-A β (1-40)/IAPP, gemessen mittels Fluoreszenzspektroskopie bei 25 °C. DAC-A β (1-40) (10 nM) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen (50, 100, 300 nM) an IAPP-GI oder IAPP in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP gemischt. Die Ausbildung der Heterokomplexe war durch die Abnahme des Signals bei $t = 0$ zu sehen (relative Fluoreszenz bei 0,65 statt 1). Innerhalb von 20 h wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität bei 465 nm gemessen. Alle Werte beziehen sich auf die Fluoreszenzemission von DAC-A β (1-40) 10 nM allein bei $t = 0$ (relative Fluoreszenz: 1,0). Die Daten wurden mit folgender Formel normiert: $F_{\text{relativ}} = 1 \times F_{\text{DAC-A}\beta(1-40) \text{ t=0}} / F$. (A) Fluoreszenzmission bei 465 nm von DAC-A β (1-40) allein ($n = 4$), des DAC-A β (1-40)/IAPP-GI- (1/100, $n = 4$) und DAC-A β (1-40)/IAPP-Komplexes (1/100, $n = 11$) in Abhängigkeit von der Zeit. (B) Durch höhere IAPP-Konzentrationen nahm die Fluoreszenz des DAC-A β (1-40)/IAPP-Komplexes zu. (C) Die Fluoreszenzwerte der 1/50, 1/100 und 1/300 DAC-A β (1-40)/IAPP-GI-Lösungen blieben innerhalb von 20 h konstant. Die Messung wurden dreimal durchgeführt (Mittelwert $\pm$ SEM).

In einer weiteren Versuchreihe wurde die Ursache der Instabilität des DAC-A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexes näher untersucht. In Abbildung 3.16 B sind die 11 Messungen aus denen der Mittelwert ($\pm$ SEM, siehe Abbildung 3.16 A) berechnet wurde dargestellt. Ausgehend vom Signal bei $t = 0$ wurden Fluoreszenzänderungen von +200 % bis -67 % gemessen. Aufgrund dieser Daten wurde die Komplexstabilität auch bei einer Temperatur von 4 °C untersucht. In Abbildung 3.16 C ist zu sehen, dass die niedrigere Temperatur keinen Einfluss auf den Signalverlust von DAC-A β (1-40) allein hatte (vgl. mit Abbildung 3.16 A). Die Veränderung der

Fluoreszenzintensität des DAC-A β (1-40)/IAPP-Komplexes war jedoch im Vergleich zu den Messungen bei 25 °C deutlich niedriger und stabiler (ΔF -33 %). Im Einschub der Abbildung 3.16 sind die 4 Einzelmessungen von DAC-A β (1-40) + IAPP zum Vergleich mit den 11 Messungen bei 25 °C dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der IAPP-Aggregation auf die Stabilität der Heterokomplexe mit DAC-A β (1-40) untersucht. Fluorescein-markiertes IAPP (1 nM) wurde mit 1000-fachem Überschuss an IAPP (1 μ M) gemischt. Bei den DAC-A β (1-40)/IAPP-Untersuchungen betrug die IAPP-Konzentration ebenfalls 1 μ M (Abbildung 3.15 A). Die Wechselwirkung der IAPP-Moleküle führte zu einem Anstieg der Emission um 120 % (Abbildung 3.16 D, relative Fluoreszenz $\uparrow$ von 1,0 auf 2,2). Aufgrund der IAPP-Aggregation wurde bei 25 °C innerhalb von 20 h ein kontinuierlicher Signalverlust bis zu 89 % gemessen. Durch die niedrigere Temperatur von 4 °C wurde die Fluoreszenzabnahme verringert, was auf eine Hemmung der IAPP-Selbstassoziation hinweist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Instabilität der DAC-A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe mit der IAPP-Aggregation zusammenhängt.

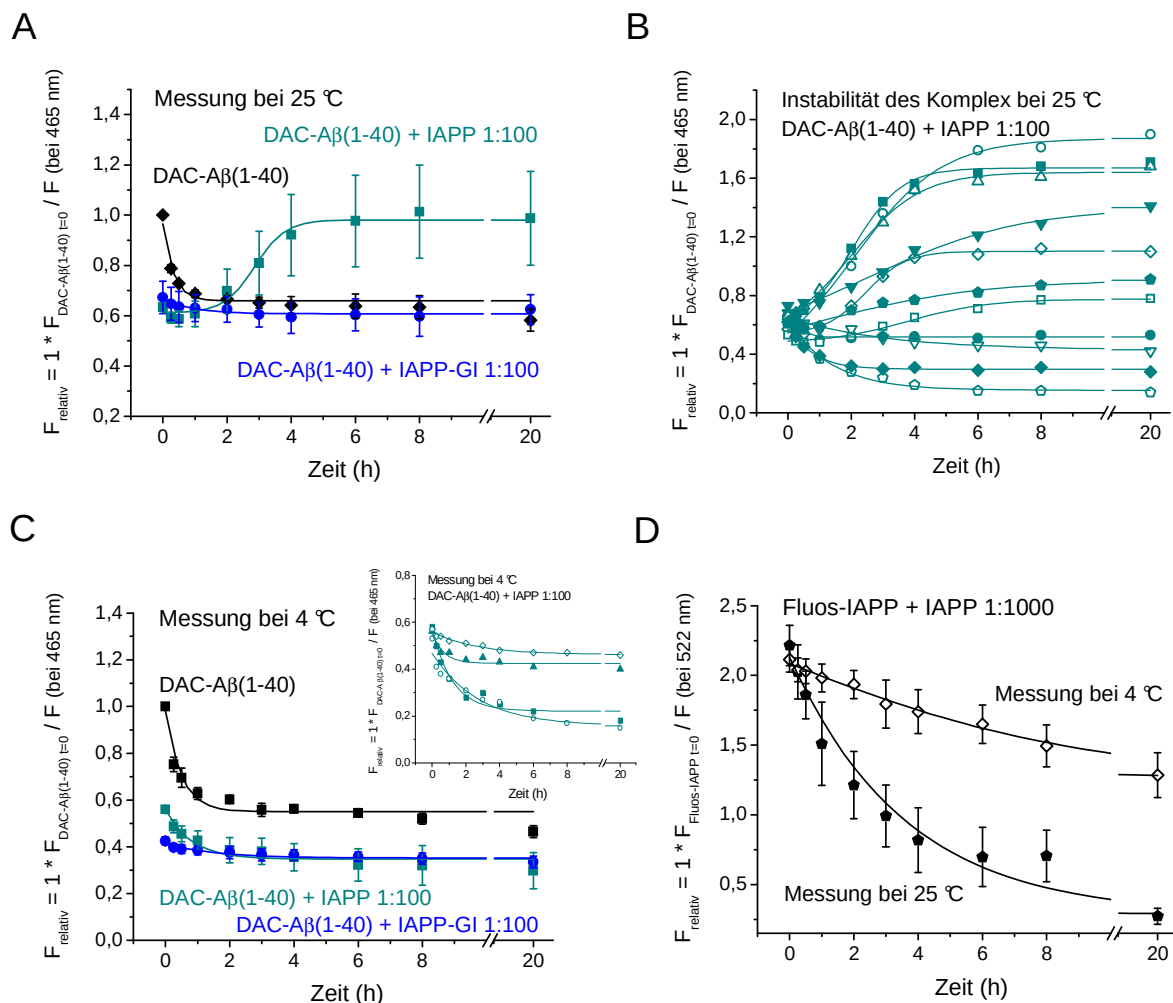


Abbildung 3.16: Zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenzemission der DAC-A β (1-40)/IAPP- und Fluos-IAPP/IAPP-Komplexe. DAC-A β (1-40) 10 nM wurde mit 100 nM IAPP oder IAPP-GI in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP gemischt. Zu Fluos-IAPP 1nM wurde 1 μ M IAPP dazugegeben

(10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP). Innerhalb von 20 Stunden wurde bei 25 °C und 4 °C die Veränderung der Fluoreszenzintensität bei 465 nm (DAC-A β (1-40)) oder bei 522 nm (Fluos-IAPP) gemessen. Die Fluoreszenzemissionen wurden anhand folgender Formel auf die Fluoreszenz von DAC-A β (1-40) 10 nM allein bei t = 0 (relative Fluoreszenz: 1,0) bzw. von Fluos-IAPP allein bei t = 0 (relative Fluoreszenz: 1,0) normiert: $F_{\text{relativ}} = 1 \times F_{\text{markiertes Peptid t=0}} / F$. (A) Messungen bei 25 °C: DAC-A β (1-40) 10 nM (n = 4), DAC-A β (1-40) + IAPP-GI (1/100, aus n = 4), DAC-A β (1-40) + IAPP (1/100, aus n = 11) (B) Instabilität des DAC-A β (1-40)/IAPP-Komplexes verdeutlicht dargestellt durch die bei 25 °C durchgeführten 11 Einzelmessungen. (C) Messungen bei 4 °C aus n = 4: DAC-A β (1-40) 10 nM, DAC-A β (1-40) + IAPP-GI (1/100), DAC-A β (1-40) + IAPP (1/100). Im Einschub sind die 4 Einzelmessungen der DAC-A β (1-40)/IAPP-Mischung dargestellt. (D) Fluoreszenzabnahme der Fluos-IAPP/IAPP-Komplexe in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur (25 ° und 4 °C). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus vier unabhängigen Messungen.

Zusätzlich wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, um die Ursache für die Instabilität von DAC-A β (1-40) aufzuklären. Zunächst wurde untersucht, ob die Abnahme des Signals mit der Selbstassoziation von DAC-A β (1-40) zusammenhängt. Die Änderung der Fluoreszenzintensität (bei 465 nm) verschiedener DAC-A β (1-40)-Konzentrationen (1-360 nM) wurde innerhalb von 6 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.17 A dargestellt. Um die zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzemission vergleichen zu können, wurde bei jeder Konzentration die Fluoreszenz von DAC-A β (1-40) bei t = 0 auf 1 gesetzt (relative Fluoreszenz = 1,0) und alle anderen Messdaten auf diesen Wert normiert (Formel: $F_{\text{relativ}} = 1 \times F_{\text{DAC-A}\beta(1-40) \text{ t=0}} / F$, Abbildung 3.17 B). Anhand dieser Messreihe ist deutlich zu sehen, dass die Fluoreszenzemission von DAC-A β (1-40) mit zunehmender Konzentration stabiler wurde.

Im nächsten Schritt wurde untersucht ob die Abnahme der Fluoreszenz mit einer Instabilität des Fluorophors DAC im Zusammenhang steht. DAC 10 nM wies ein deutlich geringeres Signal als DAC-A β (1-40) auf, die Fluoreszenz blieb jedoch während des gemessenen Zeitraums stabil.

Um aufzuklären ob sich bei der Signalabnahme von DAC-A β (1-40) (10 nM) um eine Dissoziation handelt wurde eine Kinetik unter denaturierenden Bedingungen, in 6 M Guanidinium (Gdn)-Puffer, durchgeführt. Die Fluoreszenzemission des entfalteten DAC-A β (1-40) war innerhalb der Messdauer stabil und um 55 % geringer als diejenige von nicht-denaturiertem bei t = 0. Das Signal von assoziierten und gefalteten DAC-A β (1-40)-Molekülen nahm innerhalb von einer Stunde um 36 % ab und blieb danach stabil. Die Daten deuten drauf hin, dass die zeitabhängige Veränderung der Fluoreszenzemission von DAC-A β (1-40) (10 nM) durch eine Dissoziation hervorgerufen wird.

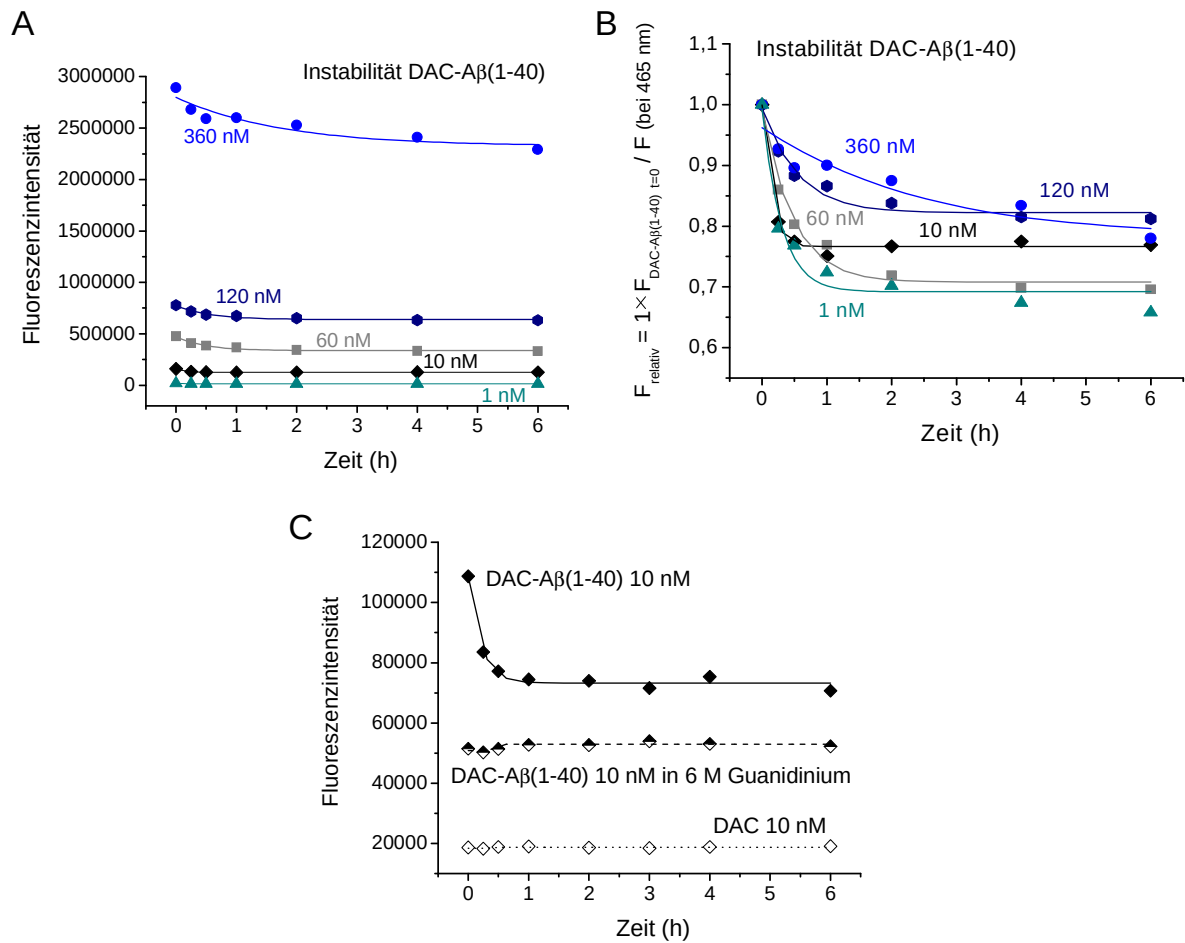


Abbildung 3.17: Veränderung der Fluoreszenzemission der DAC-Aβ(1-40)/Aβ(1-40)-Komplexe in Abhängigkeit von der Zeit, der Konzentration und des denaturierten und nicht-denaturierten Zustands von DAC-Aβ(1-40). (A) Die Fluoreszenzemission von DAC-Aβ(1-40) bei 465 nm und 25 °C wurde bei verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 60, 120 und 360 nM) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP gemessen. (B) Zum Vergleich der Fluoreszenzänderungen wurden die Messwerte für jede Konzentration auf DAC-Aβ(1-40) bei $t = 0$ normiert (relative Fluoreszenz = 1; Formel: $F_{\text{relativ}} = 1 \times F_{\text{DAC-A}\beta(1-40)} / F_{t=0}$ (gemessen bei 465 nm)). (C) Vergleich der Fluoreszenzintensität und -stabilität von DAC-Aβ(1-40), DAC allein, und DAC-Aβ(1-40) in 6 M Guanidinium gelöst in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (denaturierende Bedingungen) bei einer Konzentration von 10 nM. Alle Messungen wurden jeweils einmal durchgeführt.

3.2.7 Nachweis der Heteroaggregate von IAPP-GI mit A β (1-40) durch Cross-linking

Zur Charakterisierung der IAPP-GI/A β (1-40)-Heteroaggregate wurden die Komplexe durch die Vernetzung mit Glutaraldehyd stabilisiert und mit NuPAGE und Western-Blot detektiert. Der Crosslinker besitzt zwei Aldehydgruppen, die mit den Aminoseitengruppen der Lysin- und Arginin-Reste kovalente Bindungen eingehen können. Dadurch werden verschiedene Moleküle bzw. verschiedene Einheiten eines Komplexes, die sich in räumlicher Nähe befinden, zusammengehalten. Vor dem Quervernetzen wurde IAPP-GI mit A β (1-40) 1/1 in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gemischt und zur Ausbildung der Oligomere und Komplexe zunächst 3 h bei 25 °C inkubiert.

Der anti-A β (1-40) Blot (Abbildung 3.18 links, Spur 2) zeigt, dass A β (1-40) unter diesen Bedingungen nicht nur als Monomer vorhanden ist, sondern zu Di- und in geringer Anzahl zu Trimeren assoziieren kann. Die Interaktion und Oligomerisierung beider Peptide ist durch die Ausbildung von Di-, Tri-, Tetra-, und Pentameren in der Mischung zu sehen (Abbildung 3.18 links, Spur 3). Die stabilisierten IAPP-GI-Oligomere beinhalten deutlich sichtbare di-, bis pentamere Strukturen (Abbildung 3.18 recht, Spur 5). In der Mischung des anti-IAPP-GI Blots sind Oligomere ähnlicher Größe wie bei IAPP-GI allein vorhanden. Jedoch ist die Menge an Di-, Tri- und Tetramere deutlich höher (Abbildung 3.18 rechts, Spur 6). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Di- bis Tetramere die Hauptspezies der Heterokomplexe sind. Zusätzlich zu den Proben wurde, zur Kontrolle der Antikörperdetektion, nicht-vernetztes A β (1-40) und IAPP-GI auf dem Gel aufgetragen (Abbildung 3.18, Spur 1 und 4). Eine Kreuzreaktivität der hier verwendeten Antikörper wurde durch Vorversuche ausgeschlossen.

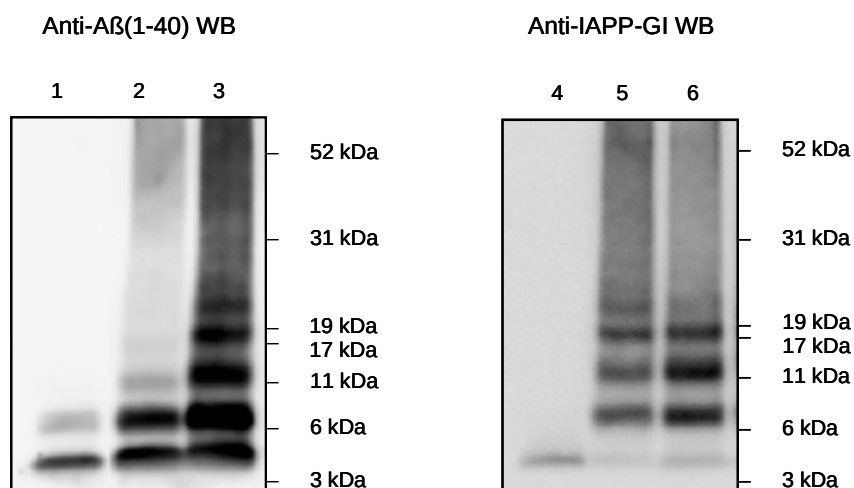


Abbildung 3.18: Heteroaggregate von A β (1-40) mit IAPP-GI nach Vernetzung mit Glutaraldehyd.

Detektion mittels NuPAGE und Western-Blot-Analyse. 50 μ M IAPP-GI wurde mit 50 μ M A β (1-40) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gemischt und für 3 h bei 25 °C inkubiert. Das Crosslinking erfolgte mit einer 25 %igen Glutardialdehyd-Lösung für 2 min bei 25 °C. Links: Western-Blot mit anti-A β (1-40) Antikörper: (1) A β (1-40) Input, ohne Vernetzung und Inkubation; (2) A β (1-40) allein und (3) 1/1 Mischung von A β (1-40) und

IAPP-GI, nach Inkubation und Crosslinking. Rechts: Anti-IAPP-GI Western-Blot: (4) IAPP-GI Input wurde nicht inkubiert und vernetzt; (5) IAPP-GI allein und (6) 1/1 Mischung von A β (1-40) und IAPP-GI, die Proben wurden inkubiert und vernetzt. Die Western-Blots sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.2.8 Nachweis der A β (1-40)/IAPP-GI- und A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe mittels Immunogoldmarkierung

Um die Struktur der A β (1-40)/IAPP-GI- bzw. A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe (siehe Abbildung 3.18) detaillierter zu untersuchen, wurden gealterte (3-7 Tage) A β (1-40)/IAPP-GI- bzw. A β (1-40)/IAPP-Lösungen (1/1, 16,5 μ M in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C) immunogoldmarkiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Nach der Inkubation der Proben wurden diese auf kohlebeschichtete Kupfernetze pipettiert. Die auf der Oberfläche der Kupfernetze absorbierten Peptide wurden mit primären und danach mit sekundären Antikörpern, welche mit Goldpartikeln versehen waren nachgewiesen. Die Größe der Goldpartikel zur Detektion von A β (1-40) betrug 5 nm, die auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen als schwarze Punkte zu sehen sind. Die sekundären Antikörper gegen IAPP-GI- bzw. IAPP-Moleküle waren mit 10 nm großen Goldpartikeln versehen.

Abbildung 3.19 A und B zeigen hetero-fibrilläre Aggregate, die in 7 Tage gealterten A β (1-40)/IAPP-Lösungen gebildet wurden und aus A β (1-40)- und IAPP-Molekülen bestehen. Die IAPP-Moleküle sind durch große schwarze Punkte markiert. Die kleineren Goldkugeln, welche die A β (1-40)-Moleküle nachweisen, sind mit roten Pfeilen hervorgehoben. Zusätzlich wurden in der A β (1-40)/IAPP-Mischung geordnete homo- (blaue Kreise) und heterogene Oligomere (rote Kreise) nachgewiesen (Abbildung 3.19 C). In der gealterten A β (1-40)/IAPP-GI-Lösung konnten dagegen nur kleine homo- (blaue Kreise) und heterogene oligomere Komplexe (rote Kreise), aber keine multimeren oder fibrillären Strukturen detektiert werden.

Anhand dieser Untersuchungsmethode konnte gezeigt werden, dass die ausgebildeten oligomeren A β (1-40)/IAPP-GI-Komplexe stabil sind und nicht weiter zu gemischten Fibrillen aggregieren. Im Gegensatz dazu kann A β (1-40) mit IAPP zu hetero-oligomeren und hetero-fibrillären Aggregaten assoziieren.

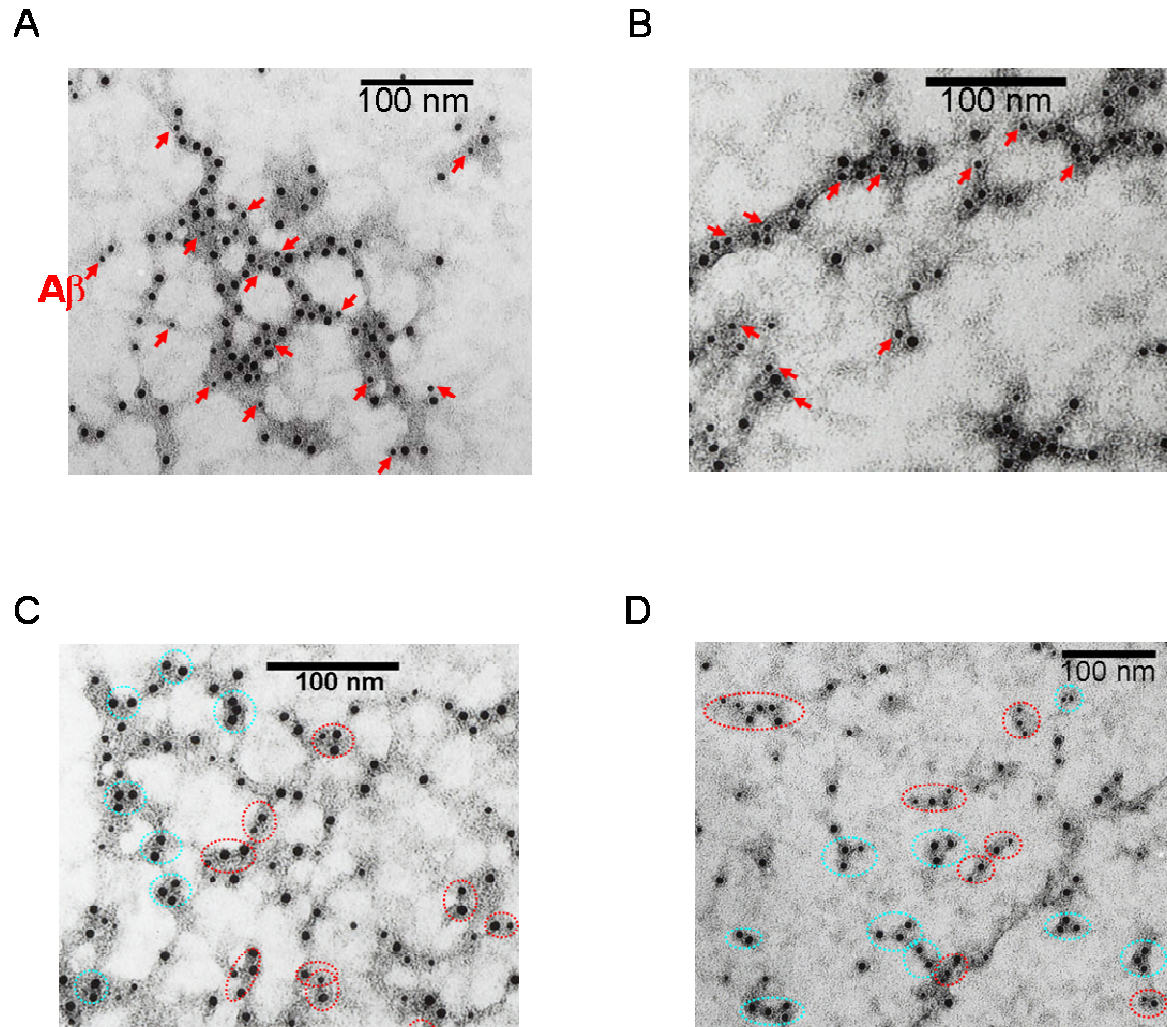


Abbildung 3.19: Nachweis der $A\beta(1-40)/IAPP$ - und $A\beta(1-40)/IAPP-GI$ -Heterokomplexe mittels Immungoldmarkierung und elektronenmikroskopischer Untersuchung. Zur Ausbildung von Aggregaten wurde eine 1/1- $A\beta(1-40)/IAPP$ -Mischung ($16,5 \mu M$) für 7 Tage und eine 1/1- $A\beta(1-40)/IAPP-GI$ -Mischung für 3 Tage in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei $25^\circ C$ inkubiert. Die Lösungen wurden danach auf kohlebeschichtete Kupfernetze gegeben. Die absorbierten Peptide wurden mit primären und sekundären Antikörpern, welche mit Goldpartikeln versehen waren markiert (Goldpartikel $\varnothing 10 \text{ nm} \triangleq IAPP$ bzw. $IAPP-GI$ -Moleküle, Goldpartikel $\varnothing 5 \text{ nm} \triangleq A\beta(1-40)$ -Moleküle). (A-C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von oligomeren und fibrillären $A\beta(1-40)/IAPP$ -Heterokomplexen. In (A) und (B) sind die 5 nm Goldpartikel ($A\beta(1-40)$ -Moleküle) mit roten Pfeilen hervorgehoben. (D) Nachweis der homo- und hetero-oligomeren Aggregate einer gealterten 1/1- $A\beta(1-40)/IAPP-GI$ -Lösung. Die Homo-Oligomere sind durch blaue Kreise und die Hetero-Oligomere durch rote Kreise markiert.

3.3 Untersuchung der Wechselwirkung von IAPP-GI mit A β (1-42)

3.3.1 Effekt von IAPP-GI auf die Selbstassoziation von A β (1-42) zu toxischen Aggregaten

Da die extrazellulären Ablagerungen bei der Alzheimer Erkrankung hauptsächlich aus den Amyloid- β -Peptiden A β (1-40) und A β (1-42) bestehen, wurde hier das Inhibitionsvermögen von IAPP-GI auch auf die A β (1-42)-Aggregation untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass A β (1-42) im Vergleich zu A β (1-40) stärker zur Aggregation neigt und eine höhere Neurotoxizität aufweist [257, 132].

Hierfür wurde A β (1-42) in einem Mischungsverhältnis von 1/1 und 1/10 mit IAPP-GI in Zellkulturmedium gemischt und zur Ausbildung der Aggregate für 20 h bei 25 °C inkubiert. Um die A β (1-42)-Aggregation zu induzieren wurde zuvor das Peptid in einem 35 % (v/v) ACN/0,1 % (v/v) TFA-Wassergemisch (1 mg/ml) gelöst, für 1 h bei 25 °C inkubiert, lyophilisiert und für die Herstellung der Lösungen in Zellkulturmedium verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurden die gealterten Lösungen für weitere 20 h zu PC-12 Zellen gegeben.

Abbildung 3.20 zeigt die zytotoxische Wirkung von A β (1-42) gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays. Bei einer A β (1-42)-Konzentration von 100 nM auf die Zellen – A β (1-42) wurde bei einer Konzentration von 200 nM vorinkubiert – sinkt die Zellvitalität auf 58 %. Im Vergleich dazu, weisen nach der Zugabe von A β (1-40) (Endkonzentration 100 nM) nur 20 % der Zellen eine Beeinträchtigung ihrer MTT-Reduktionskapazität auf (siehe Abbildung 3.5 A). Im Gegensatz zu der im Kapitel 3.2.1 beschriebenen starken inhibitorischen Wirkung von IAPP-GI auf die Bildung von toxischen A β (1-40)-Aggregaten, konnte man hier keinen signifikanten Effekt des Peptids finden. Bereits nach dem Verdünnen von A β (1-42) in Zellkulturmedium, ohne eine Vorinkubation ($t = 0$ h), werden toxische Aggregate gebildet (A β (1-42) 100 nM auf Zellen: 80 % Zellvitalität). Auch hier kann eine 1/1-Mischung mit IAPP-GI die Ausbildung dieser Spezies nicht blockieren. Ein 10-facher Überschuss an IAPP-GI hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Entstehung der toxischen A β (1-42)-Spezies (Abbildung 3.20 B). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass A β (1-42) durch die zusätzlichen zwei Aminosäurereste eine andere Struktur als A β (1-40) ausbildet, deren weitere Missfaltungs- und Aggregationsprozesse sich durch die Anwesenheit von IAPP-GI nicht beeinträchtigen lassen.

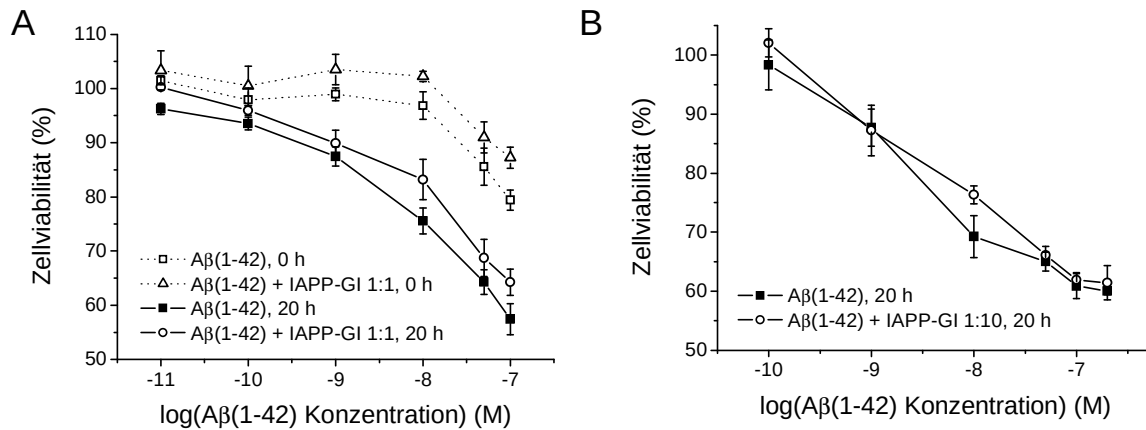


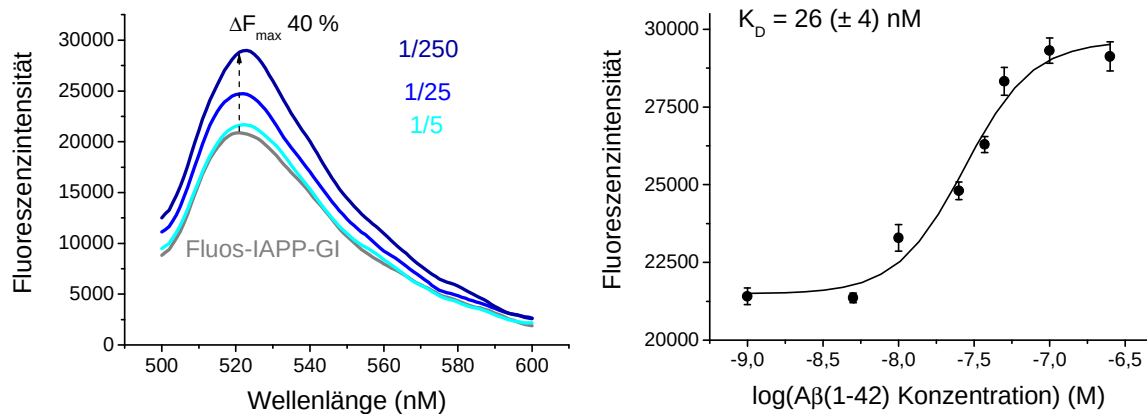
Abbildung 3.20: Zytotoxizität der Aβ(1-42)-Aggregate auf PC-12 Zellen in der An- und Abwesenheit von IAPP-GI. Aβ(1-42) (10 pM-100 nM) wurde 1/1 und 1/10 mit IAPP-GI in Zellkulturmedium gemischt. Nach einer 20-stündigen Inkubation bei 25 °C wurden die Lösungen für weitere 20 h zu PC-12 Zellen gegeben. Zur Detektion der Toxizität wurde der MTT-Reduktionsassay durchgeführt. (A) Aβ(1-42) allein und 1/1-Mischungen mit IAPP-GI. Die Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 3 Assays (je n = 3). (B) Aβ(1-42) allein und mit 10-fachem Überschuss an IAPP-GI. Für alle Datenpunkte wurde ein Experiment in Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.3.2 Bindung von Aβ(1-42) an IAPP-GI

Um die Fragestellung nachzugehen, weshalb IAPP-GI die zytotoxische Aβ(1-42)-Aggregation nicht unterbinden kann, wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie die Affinität der Peptid/Peptid-Wechselwirkung untersucht. N^α-terminal Fluorescein-markiertes IAPP-GI wurde mit Aβ(1-42) bei 25 °C in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP titriert. Die Fluoreszenzemission des Fluos-IAPP-GI wurde nach einer Anregung bei 492 nm zwischen 500-600 nm gemessen (Abbildung 3.21 A links). Durch die Bindung der Peptide erhöhte sich die Emission des Fluorophors. Die Fluoreszenzemissionen bei 522 nm sind in Abbildung 3.21 A (rechts) in Abhängigkeit von der Aβ(1-42)-Konzentration dargestellt. Die Titrationskurve zeigt, dass Aβ(1-42) mit IAPP-GI im nanomolaren Bereich wechselwirken kann.

Da IAPP-GI eine modifizierte Sequenz des IAPP ist, wurde auch die Aβ(1-42)/IAPP-Interaktion untersucht. Es stellte sich heraus, dass auch IAPP an Aβ(1-42) mit einer Affinität im niederen nanomolaren Bereich binden kann (Abbildung 3.21 B). Diese Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass die N-Methylierungen des IAPP-GI zu einer Verdreifachung der Bindungsaffinität des IAPP-Moleküls an Aβ(1-42) geführt haben.

A

Fluos-IAPP-GI 1 nM + A β (1-42)

B

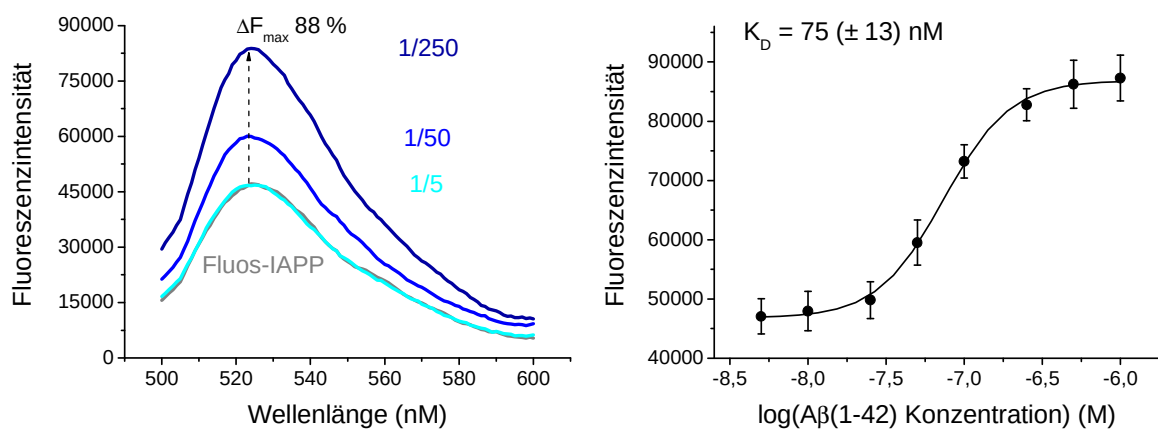
Fluos-IAPP 1 nM + A β (1-42)

Abbildung 3.21: Bindung von A β (1-42) an Fluorescein-markiertem IAPP-GI und IAPP.

1 nM Fluos-IAPP-GI (A) oder Fluos-IAPP (B) wurden mit A β (1-42) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 1 % HFIP bei 25 °C titriert. Es wurden Änderungen der Fluoreszenzintensität des Fluorophors gemessen. Die Emissionsspektren sind links dargestellt. Von jedem Spektrum wurde das Hintergrundsignal abgezogen. Die maximale Fluoreszenzänderung ist bei einem 250-fachen Überschuss an A β (1-42) angegeben. Rechts in der Abbildung sind die Fluoreszenzemissionen bei 522 nm in Abhängigkeit von der A β (1-42)-Konzentration dargestellt. Die Messungen wurden dreimal durchgeführt und die Dissoziationskonstanten bestimmt. Aus diesen drei Werten wurde der Mittelwert der $K_D \pm \text{SEM}$ berechnet.

Zusätzlich wurde die A β (1-42)/IAPP-GI-Wechselwirkung mithilfe des Biotin-pull-down-Assays näher untersucht. N $^{\alpha}$ -aminoterminal biotinyliertes IAPP-GI (Biotin-IAPP-GI) wurde 1/2 mit frisch gelöstem A β (1-42) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C inkubiert. Durch dieses Mischungsverhältnis wurde die Ausbildung der Heterokomplexe begünstigt. Die Heterokomplexe wurden über ihre spezifische Bindung an Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen aus der Lösung isoliert. Nach Ablösen der Komplexe von den Kügelchen wurden eine NuPAGE-Elektrophorese und eine Western-Blot (WB) durchgeführt. Der Nachweis wurde mit einem gegen A β (1-40) gerichteten Antikörper durchgeführt, der auch mit A β (1-42) kreuzreagiert. Für Biotin-IAPP-GI wurde ein Streptavidin-POD-Konjugat-

Antikörper verwendet. Zur Kontrolle der Detektion wurde als „Input“ frisch gelöstes A β (1-42) und Biotin-IAPP-GI auch auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden die Peptide mit Silberfärbung auf Teilen der Gele detektiert. Aus den Lösungen Biotin-IAPP-GI allein (Abbildung 3.22 A, links Spur 2) und der 1/2 Biotin-IAPP-GI/A β (1-42) Mischung (Abbildung 3.22 A, links Spur 3) wurde die gleiche Menge an biotinyliertem IAPP-GI an den Streptavidin-Kügelchen gebunden. Die Ausbildung von Biotin-IAPP-GI/A β (1-42)-Komplexe hatte keinen Einfluss auf die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung.

Die Silberfärbung war zum Nachweis des Peptids Biotin-IAPP-GI nicht genügend sensitiv. (Abbildung 3.22 A rechts; Spur 1: Biotin-IAPP-GI Input, Spur 2: Biotin-IAPP-GI allein). Nur monomeres (15 kDa) und tetrameres (60 kDa) Streptavidin, das bei der Probenaufarbeitung für die Elektrophorese von den Streptavidin-Kügelchen gelöst wurde, konnte detektiert werden (Abbildung 3.22 A rechts, Spur 2).

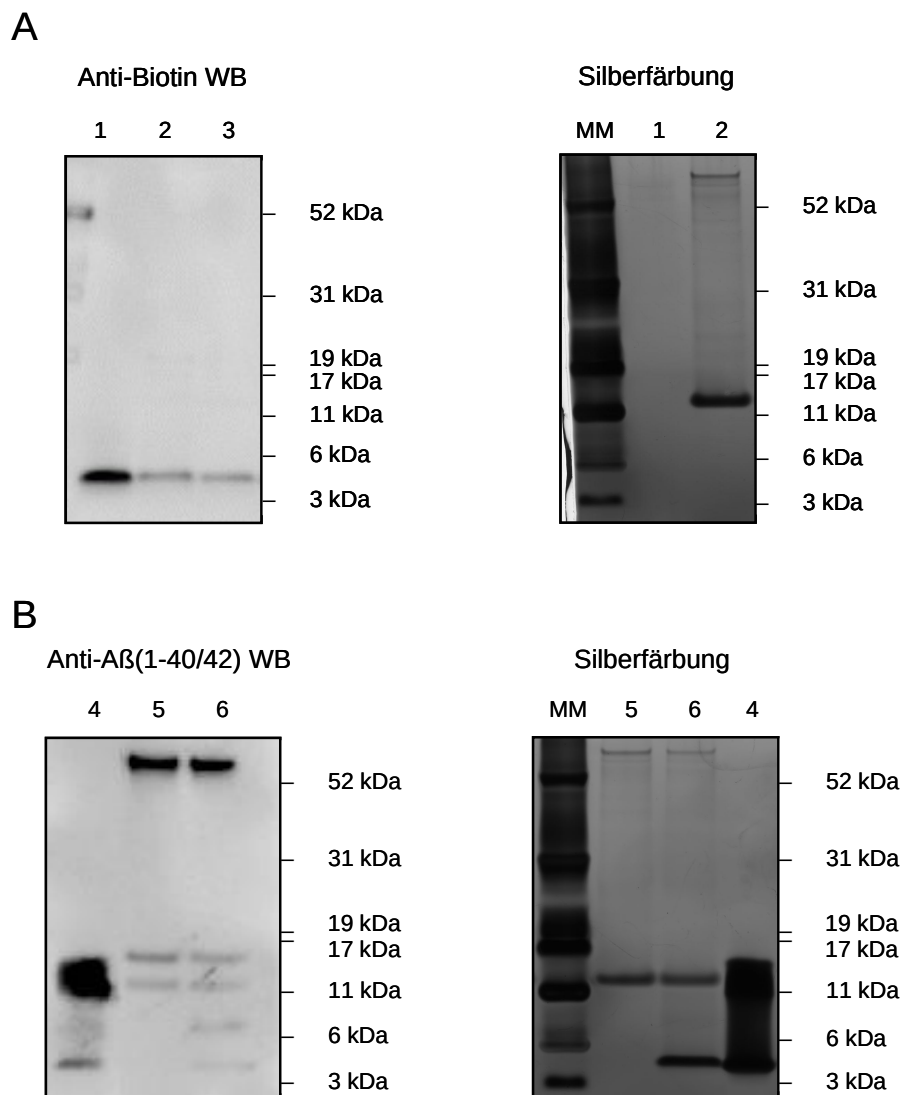


Abbildung 3.22: Nachweis der A β (1-42)/Biotin-IAPP-GI-Heterokomplexe mittels Biotin-pull-down-Assay. 2,5 μ M Biotin-IAPP-GI und 5 μ M A β (1-42) wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C inkubiert (1 h). Mit A β (1-42) assoziiertes und freies Biotin-IAPP-GI wurde mittels der Bindung an

Streptavidin-Kügelchen aus den Lösungen isoliert. Zur Abtrennung der Peptide von den Kügelchen wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf 95 °C erhitzt. Nach Auftrennung mittels NuPAGE wurden die Peptide auf eine Membran geblottet und anhand eines Streptavidin-POD-Konjugats und anti-A β (1-40)-Antikörpers nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Gele zum Nachweis der Peptide mit Silber gefärbt. (A) links, anti-Biotin WB: Spur 1: frisch gelöstes Biotin-IAPP-GI als Input (2 μ g); Spur 2: mit Kügelchen inkubiertes Biotin-IAPP-GI (2,5 μ M); Spur 3: 1/2 Biotin-IAPP-GI/A β (1-42)-Mischung inkubiert mit Kügelchen. (A) rechts, Silberfärbung: Proteinmarker (MM, Multimarker) 3 bis 52 kDa; Spur 1 und 2 siehe oben (A links). (B) links, anti-A β (1-40) WB: Spur 4: A β (1-42) Input frisch gelöst (2 μ g); Spur 5: mit Kügelchen inkubiertes A β (1-42) (5 μ M); Spur 6: 1:2 Biotin-IAPP-GI/A β (1-42)-Mischung inkubiert mit Kügelchen. (B) rechts, Silberfärbung: Proteinmarker (MM, Multimarker) 3 bis 52 kDa; Spur 4 bis 6 siehe oben (B links). Die Western-Blots und Silbergele sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Anhand des anti-A β (1-40) Antikörpers konnten nicht nur Monomere sondern auch Aggregate des Amyloid- β -Peptids (1-42) nachgewiesen werden. Frisch gelöstes A β (1-42) (5 μ g) bestand aus Monomere und zu trimeren assoziierten Oligomeren (Abbildung 3.22 B links, Spur 4). In Spur 5 des anti-A β (1-42) WB ist zu sehen, dass während der einstündigen Inkubation A β (1-42) unspezifisch an das Streptavidin der beschichteten Kügelchen gebunden hatte (monomeres Streptavidin bei 15 kDa und tetrameres bei 60 kDa). Aus der Lösung der A β (1-42)/IAPP-GI-Mischung wurde in geringen Mengen mono- und dimeres A β (1-42) isoliert, was auf eine spezifische Bindung an Biotin-IAPP-GI deutet (Abbildung 3.22 B links, Spur 6). Auch hier ist die unspezifische Bindung von A β (1-42) an Streptavidin zu sehen.

Im Gegensatz zum Biotin-IAPP-GI konnten niedermolekulare Oligomere (A β (1-42)-Input) und monomeres A β (1-42) mittels der Silberfärbung nachgewiesen werden (Abbildung 3.22 B rechts, Spur 4: A β (1-42) Input 5 μ g). So konnte Monomeres A β (1-42), welches durch die spezifische Bindung an Biotin-IAPP-GI aus der Lösung isoliert wurde, anhand der Silberfärbung deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 3.22 B rechts, Spur 6: A β (1-42)/IAPP-GI-Mischung). Bei den weiteren Banden in Spur 5 und 6 handelt es sich um monomeres und tetrameres Streptavidin. Diese Ergebnisse zeigen, dass A β (1-42) an Biotin-IAPP-GI bindet.

3.3.3 Nachweis der A β (1-42)/IAPP-GI-Heteroaggregate durch Crosslinking

Anhand des Fluoreszenz- und Pull-down-Assays konnte gezeigt werden, dass IAPP-GI an A β (1-42) binden kann. Doch die Fragestellung, weshalb IAPP-GI nicht die zytotoxische A β (1-42)-Aggregation inhibieren kann, ist dadurch nicht geklärt. Um die A β (1-40)/IAPP-GI- mit den A β (1-42)/IAPP-GI-Heteroaggregaten vergleichen zu können, wurde A β (1-42) mit IAPP-GI (1/1) inkubiert und die gebildeten Komplexe durch Vernetzung mit Glutaraldehyd stabilisiert. Nach der NuPAGE-Elektrophorese wurden die Peptide mittels Western-Blot unter Verwendung eines anti-A β (1-40)- und anti-IAPP-GI-Antikörpers detektiert.

Durch das Crosslinking mit Glutaraldehyd wurden in der Inkubationslösung von A β (1-42) allein vor allem A β (1-42)-Dimere und in geringen Mengen auch A β (1-42)-Trimere stabilisiert (Abbildung 3.23 links, Spur 2). In der A β (1-42)/IAPP-GI-Mischung konnte jedoch A β (1-42) durch die Bindung an IAPP-GI nicht nur Heterodimere ausbilden, sondern aggregierte weiter zu tri- und tetramere Heterooligomere (Spur 3). Wie bereits in Kapitel 3.2.7 gezeigt, kann IAPP-GI zu di- bis pentamere Strukturen assoziieren (Abbildung 3.23 rechts, Spur 5). Anhand des anti-IAPP-GI Antikörpers wurden in der Mischung hauptsächlich Di- bis Tetramere und in geringeren Mengen auch hexa- bis octamere Aggregate nachgewiesen (Spur 6). Diese Untersuchung deutet darauf hin, dass ähnlich wie bei der A β (1-40)/IAPP-GI-Heteroassoziation, A β (1-42) mit IAPP-GI als Hauptspezies di- bis tetramere Komplexe ausbilden kann. Frisch gelöstes, nicht-vernetztes A β (1-42) und IAPP-GI wurden zur Kontrolle der AK-Detektion auch auf dem Gel geladen (Spur 1 und 4).

Da ein ähnliches Hetero-Oligomerisationsprofil bei den Crosslinkingexperimenten von A β (1-40) mit IAPP-GI erhalten wurde, kann anhand dieser Versuchsreihe keine eindeutige Aussage getroffen werden, weshalb IAPP-GI, trotz der Bindung an A β (1-42), die Ausbildung der toxischen Aggregate nicht blockieren kann.

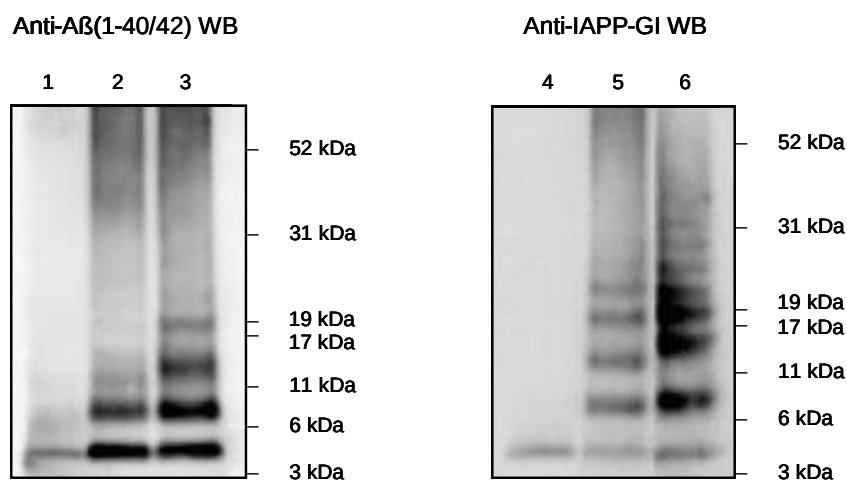


Abbildung 3.23: Heterokomplexe von A β (1-42) mit IAPP-GI nach Vernetzung mit Glutaraldehyd.

Detektion mittels NuPAGE und Western-Blot-Analyse. 50 μ M IAPP-GI wurde mit 50 μ M A β (1-40) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gemischt und für 3 h bei 25 $^{\circ}$ C inkubiert. Das Crosslinking erfolgte mit einer 25 %igen Glutardialdehyd-Lösung für 2 min bei 25 $^{\circ}$ C Links: Western-Blot mit anti-A β (1-40) Antikörper: (1)

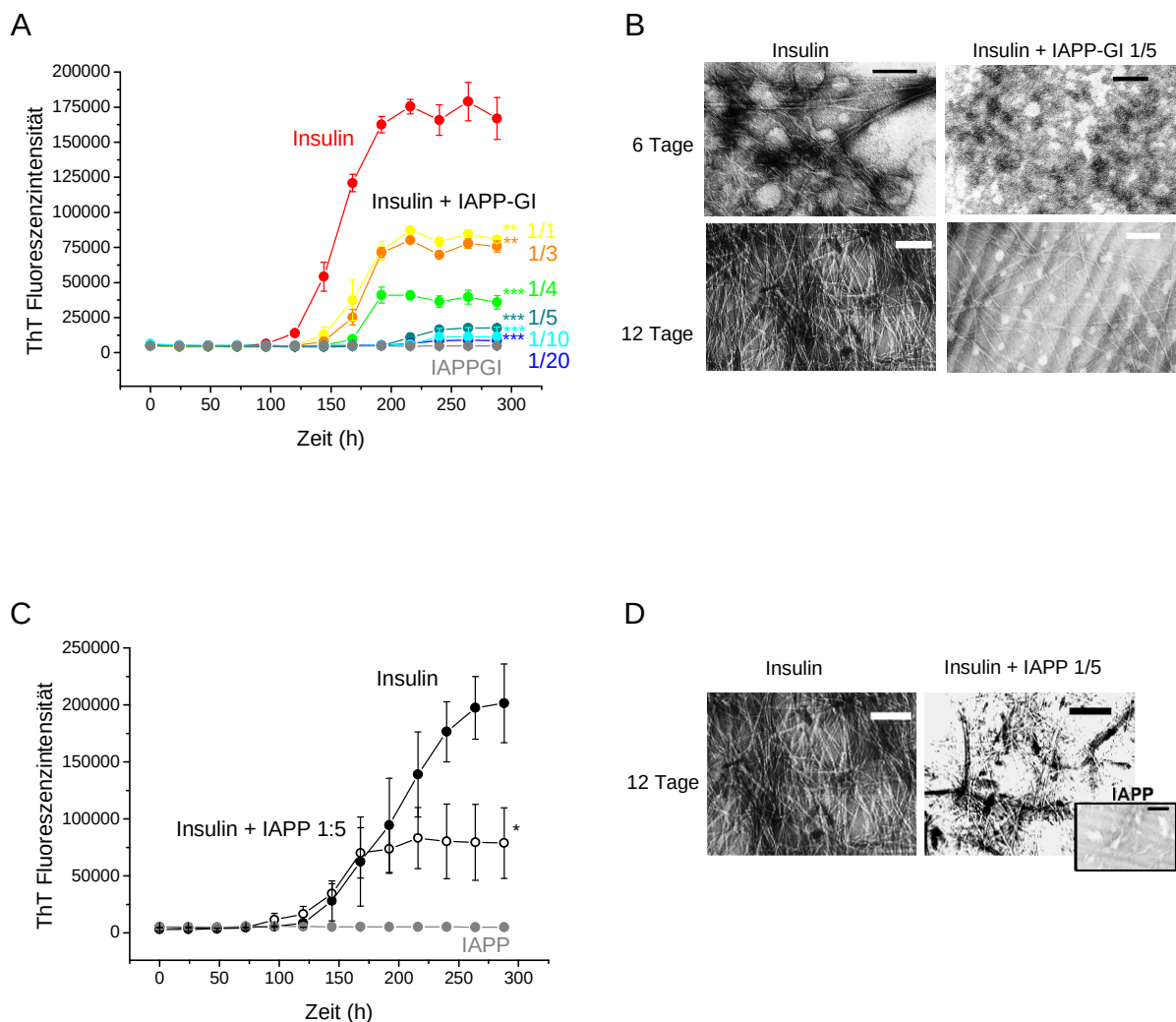
A β (1-42) Input, ohne Vernetzung und Inkubation; (2) A β (1-42) allein und (3) 1/1 Mischung von A β (1-42) und IAPP-GI, die Proben wurden inkubiert und vernetzt. Rechts: Anti-IAPP-GI Western-Blot: (4) IAPP-GI Input ohne Inkubation und Vernetzung; (5) IAPP-GI allein und (6) 1/1 Mischung von A β (1-42) und IAPP-GI, die Proben wurden inkubiert und vernetzt. In allen Spuren wurden gleiche Mengen an A β (1-42) und IAPP-GI geladen. Die Western-Blots sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.4 Einfluss der IAPP-Analoga und von IAPP auf die Bildung von Insulinfibrillen und zytotoxischen Aggregaten

3.4.1 Hemmung der Insulinaggregation zu Fibrillen

Da anhand von *in vitro* Studien bereits gezeigt wurde, dass Insulin an IAPP binden und dessen Fibrillogenese inhibieren kann [61, 62, 250-252], wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die IAPP-Analoga mit Insulin wechselwirken und dessen Aggregation ebenfalls hemmen können. Zunächst wurde untersucht, ob IAPP-GI den Fibrillenbildungsprozess von Insulin unterbinden kann. In neutralen zinkfreien Lösungen liegt Insulin in Form von Tetra- und Dimeren vor [205, 287]. Anhand von *in vitro* Untersuchungen ist bekannt, dass niedrige pH-Werte eine Destabilisierung der di- und hexameren Strukturen und somit die Bildung von monomeren Insulinmolekülen begünstigen, welche eine höhere Tendenz zur Aggregation und Fibrillenbildung aufweisen [216-218]. Daher wurde hier Insulin allein oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an IAPP-GI bei einem pH-Wert von 2 und, zur Beschleunigung der Fibrillogenese, bei einer Temperatur von 60°C inkubiert. Diese experimentellen Bedingungen entsprechen etablierten *in vitro* Bedingungen für die Untersuchung der Insulinaggregation [216-219, 221]. Die gebildeten Fibrillen wurden durch den Thioflavin T (ThT)-Bindungsassay quantifiziert. Der Fluoreszenzfarbstoff ThT bindet selektiv an Amyloidfibrillen mit β -Faltblattstruktur. Niedermolekulare Aggregate mit α -helikaler Struktur, wie Monomere und Oligomere binden dagegen nicht an ThT. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Amyloidbildung von Insulin (10 μ M) nach ca. 5 Tagen einsetzte und nach weiteren 4 Tagen abgeschlossen war (Abbildung 3.24 A und C). Die konzentrationsabhängige Hemmung der Insulin-Fibrillenbildung durch IAPP-GI ist in Abbildung 3.24 A dargestellt. Mit einem 5 bis 20-fachen Überschuss an IAPP-GI wurde eine nahezu vollständige Inhibierung erreicht. Bei einem Mischungsverhältnis von 1/1 konnte die Insulin-Fibrillenbildung nur teilweise durch IAPP-GI unterbunden werden. Nach 6 und 12 Tagen wurden Aliquots aus der Insulinlösung und der 1/5 Insulin/IAPP-GI-Mischung entnommen und elektronen-mikroskopisch untersucht. Die Aufnahmen zeigten, dass die Insulinlösung bereits nach 6 Tagen Fibrillen enthielt (Abbildung 3.24 B). Durch IAPP-GI wurde jedoch die Insulin-Fibrillenbildung beträchtlich unterdrückt. Erst nach einer Inkubation von 12 Tagen wurde auch in der Insulin/IAPP-GI-Mischung eine geringe Anzahl an Insulinfibrillen detektiert.

Bei einer 10-fach höheren Insulinkonzentration (100 μM) konnte IAPP-GI in einer 1/5-Mischung die Amyloidbildung nicht mehr vollständig inhibieren (Abbildung 3.24 E). Durch IAPP-GI setzte die Fibrillenbildung 2 Tage früher ein. Der Gehalt an Fibrillen war jedoch bei Insulin allein doppelt so hoch wie bei der Mischung. Die Beobachtung, dass IAPP-GI die Fibrillenbildung der 100 μM Insulinlösung nicht verzögern kann, könnte mit dem Vorhandensein von bereits aggregierten Insulinspezies zusammenhängen. Dem entgegen sind in Insulinlösungen < 100 μM nur monomere und dimere Insulinspezies vorhanden [212], deren Aggregation zu Fibrillen IAPP-GI deutlich inhibieren kann (Abbildung 3.24 A und B). Die Effekte aller weiteren IAPP-Analoga auf die Insulin-Fibrillenbildung wurden mit einem 5-fachen Überschuss und einer Insulinkonzentration von 10 μM untersucht. Anhand des ThT-Bindungsassays und der TEM-Aufnahmen wurden gezeigt, dass, im Gegensatz zu IAPP-GI, IAPP die Fibrillogenese von Insulin nur teilweise blockieren konnte (Abbildung 3.24 C und D). IAPP allein bildete unter diesen stark sauren Versuchsbedingungen und der verwendeten erhöhten Temperatur keine Fibrillen aus, wie es aus den ThT-Daten und TEM-Aufnahmen ersichtlich ist (Abbildung 3.24 C und D).



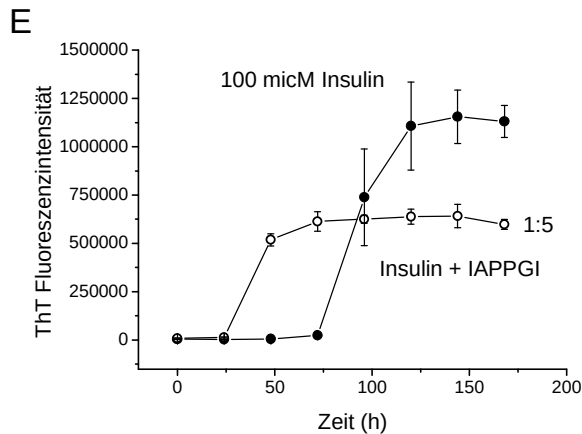


Abbildung 3.24: Inhibierung der Fibrillogenese von Insulin durch IAPP-GI und IAPP.

Die Fibrillen wurden mithilfe des Thioflavin T-Bindungsassays und anhand von TEM-Aufnahmen quantifiziert. 10 μ M Insulin, 50 μ M IAPP-GI oder IAPP und Insulin/IAPP-GI- bzw. Insulin/IAPP-Mischungen wurden mit 20 μ M des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T in Wasser pH 2 bei 60 °C inkubiert. Alle 24 h wurde die Fluoreszenzemission des Thioflavin T in der Lösung gemessen, die durch seine Anbindung an fibrilläre Strukturen bei einer Wellenlänge von 482 nm steigt. (A) ThT-Bindungsassay: Konzentrationsabhängige Inhibierung der Insulin-Fibrillenbildung durch IAPP-GI (10-200 μ M). Die Mittelwerte ($\pm$ SEM) wurden aus 3 Assays berechnet (* für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; mit ANOVA). (B) Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen der Insulinlösung und 1/5 Insulin/IAPP-GI-Mischung nach einer 6- und 12-tägigen Inkubationszeit. (C) ThT-Bindungsassay: Einfluss auf die Insulin-aggregation durch einen 5-fachen Überschuss an IAPP (Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 3$ Assays). (D) EM-Aufnahmen von Insulin, IAPP und der 1/5-Mischung nach einer Inkubation der Lösungen von 12 Tagen. (E) Thioflavin T-Assay einer 100 μ M Insulinlösung und einer 1/5 Insulin-IAPP-GI-Mischung (Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 3$ Assays, ** für $p < 0,01$ mit ANOVA).

Anschließend wurden die Effekte der anderen IAPP-Analoga IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL untersucht. Durch Zugabe von IAPP-FA setzte die Aggregation von Insulin bereits nach 2 Tagen ein (Abbildung 3.25 A). Dennoch war die Menge an gebildeten Fibrillen in der IAPP-FA-behandelten Lösung signifikant kleiner als die der Insulinlösung. IAPP-AL zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf die Insulin-Fibrillogenese (Abbildung 3.25 B). Die Mischung mit IAPP-IL führte nur zu einer Verzögerung der Insulin-Aggregation um ca. 2 Tage (Abbildung 3.25 C). rIAPP konnte ähnlich wie IAPP die Aggregation von Insulin nur teilweise unterbinden (Abbildung 3.25 D). Die IAPP-Analoga allein aggregieren nicht zu fibrillären Strukturen. Das modifizierte IAPP-Fragment, NFGAIL-GI, hatte keinen Einfluss auf die Fibrillenbildung von Insulin (Abbildung 3.25 F). Als Negativkontrolle wurde anschließend der Effekt des Peptids Parathyroidhormon (PTH) untersucht. Bei der 1/5-Mischung setzte die Fibrillogenese ca. 2 Tage früher als bei Insulin ein; der Fibrillengehalt blieb jedoch gleich (Abbildung 3.25 E).

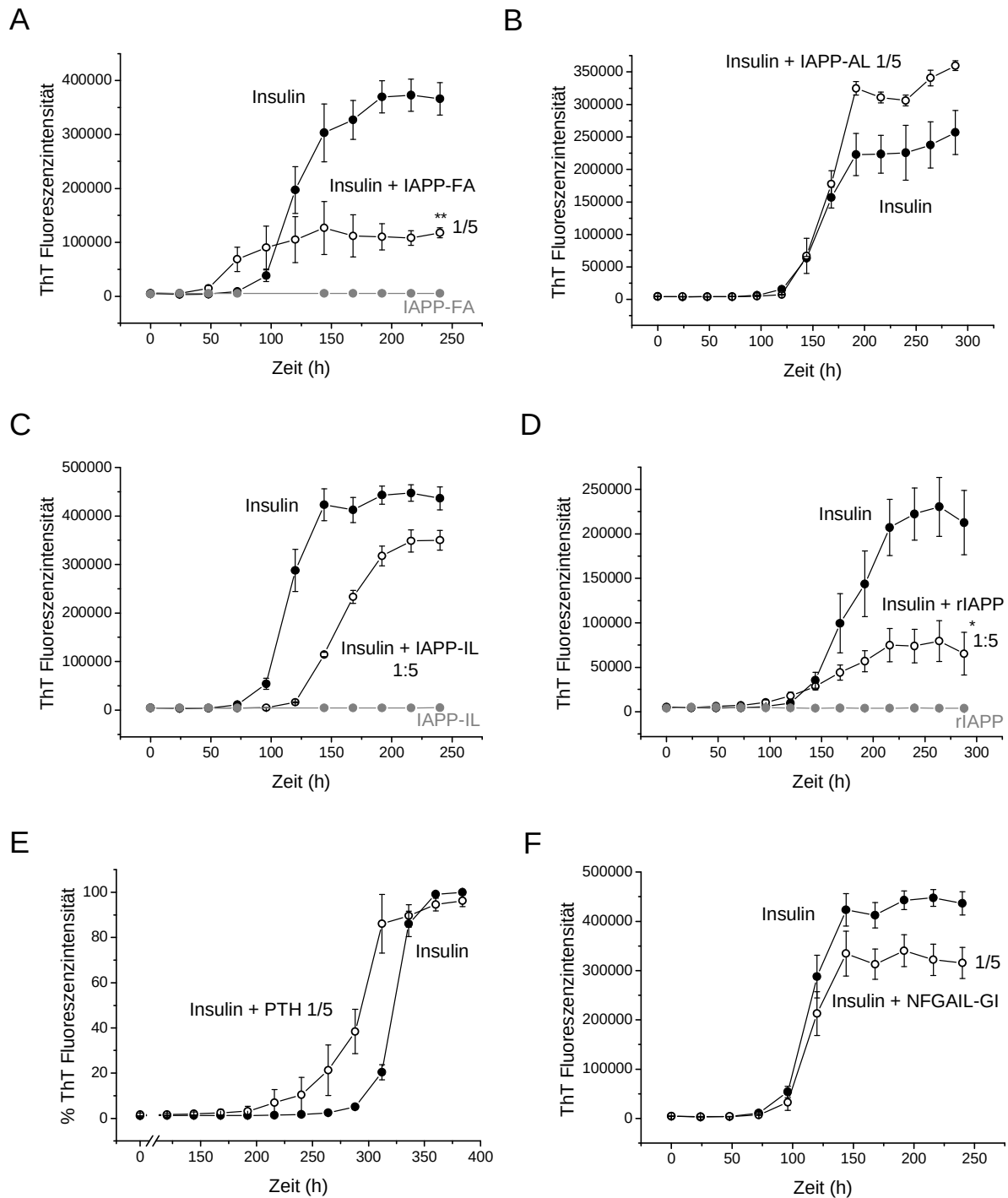


Abbildung 3.25: Effekte der IAPP-Analoga IAPP-FA, IAPP-AL, IAPP-IL, rIAPP, NFGAIL-GI und des Parathyroidhormons (PTH) auf die Insulinfibrillenbildung. Nachweis der Insulinfibrillen durch Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T (ThT). Die Fluoreszenzemission des ThT bei 482 nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Hierfür wurde Insulin (10 μ M) und 1/5-Mischungen mit IAPP-FA (A), IAPP-AL (B), IAPP-IL (C), rIAPP (D), PTH (E) und NFGAIL-GI (F) in Wasser pH 2 unter Zusatz von 20 μ M ThT bei 60 $^{\circ}$ C inkubiert. In einem Zeitraum von 10-16 Tagen wurde alle 24 h die Fluoreszenzemission gemessen. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus drei Experimenten (* für $p<0,05$; ** für $p<0,01$; mit ANOVA).

3.4.2 Effekte der IAPP-Analoga, IAPP, rIAPP und NFGAIL-GI auf die Bildung von toxischen Insulinspezies

Da der Selbstassoziationsprozess von Insulin nicht nur zu Fibrillen, sondern auch zu der Ausbildung von toxischen Aggregaten führt, wurde im Anschluss untersucht, ob IAPP-GI und die anderen IAPP-Analoga diesen Prozess blockieren können. Vorversuche zeigten, dass IAPP-GI bei einem 10-fachen Überschuss die Bildung von toxischen Insulinspezies vollständig blockieren konnte.

Insulinlösungen (20 μM) und Mischungen von Insulin mit 10-fachem Überschuss an IAPP-GI wurden, wie bei den Untersuchungen zur Insulinfibrillenbildung, bei einem pH-Wert von 2 und 60 °C zur Induktion der Insulinaggregation vorinkubiert und bei verschiedenen Zeitpunkten – nach dem Neutralisieren des pH-Werts mit Zellkulturmedium – zu Zellen der Ratteninsulinom-Zelllinie RIN5fm gegeben. Die Zellvitalität wurde durch den MTT-Reduktionsassay bestimmt. Die frisch hergestellten Lösungen – Insulin, IAPP-GI und die 1/10-Mischung – hatten keine toxische Wirkung auf die RIN-Zellen (Abbildung 3.26 A, $t = 0$ h). Die mit 24 h prä-inkubiertem Insulin (1 μM Endkonzentration) behandelten Zellen wiesen ein um 30 % reduziertes MTT-Reduktionsvermögen auf. Die höchste Toxizität wurde mit 72 h vorinkubiertem Insulin erreicht. 7 Tage gealtertes Insulin hatte den gleichen Effekt auf die Zellen wie eine 72-stündige Inkubation. IAPP-GI konnte die Entstehung zytotoxischer Insulinspezies einer 24-stündigen Inkubation vollständig blockieren. Diese Inhibierung ließ nach 48-stündiger Inkubation der Insulin/IAPP-GI-Mischung nach. Nach 7 Tagen (1 μM Insulinendkonzentration) zeigten 30 % der Zellen keine MTT-Reduktion; der Inhibierungseffekt war jedoch immer noch deutlich zu sehen. Die Ergebnisse der kinetischen Studien sind in Abbildung 3.26 B zusammengefasst. Die Zellvitalität wurde bei einer Insulinkonzentration von 1 μM (finale Konzentration auf die Zellen) gegen die Zeit aufgetragen. Dabei ist die Hemmung der Insulinaggregation zu toxischen Spezies deutlich zu sehen. IAPP-GI allein hatte keine zytotoxische Wirkung auf die RIN-Zellen.

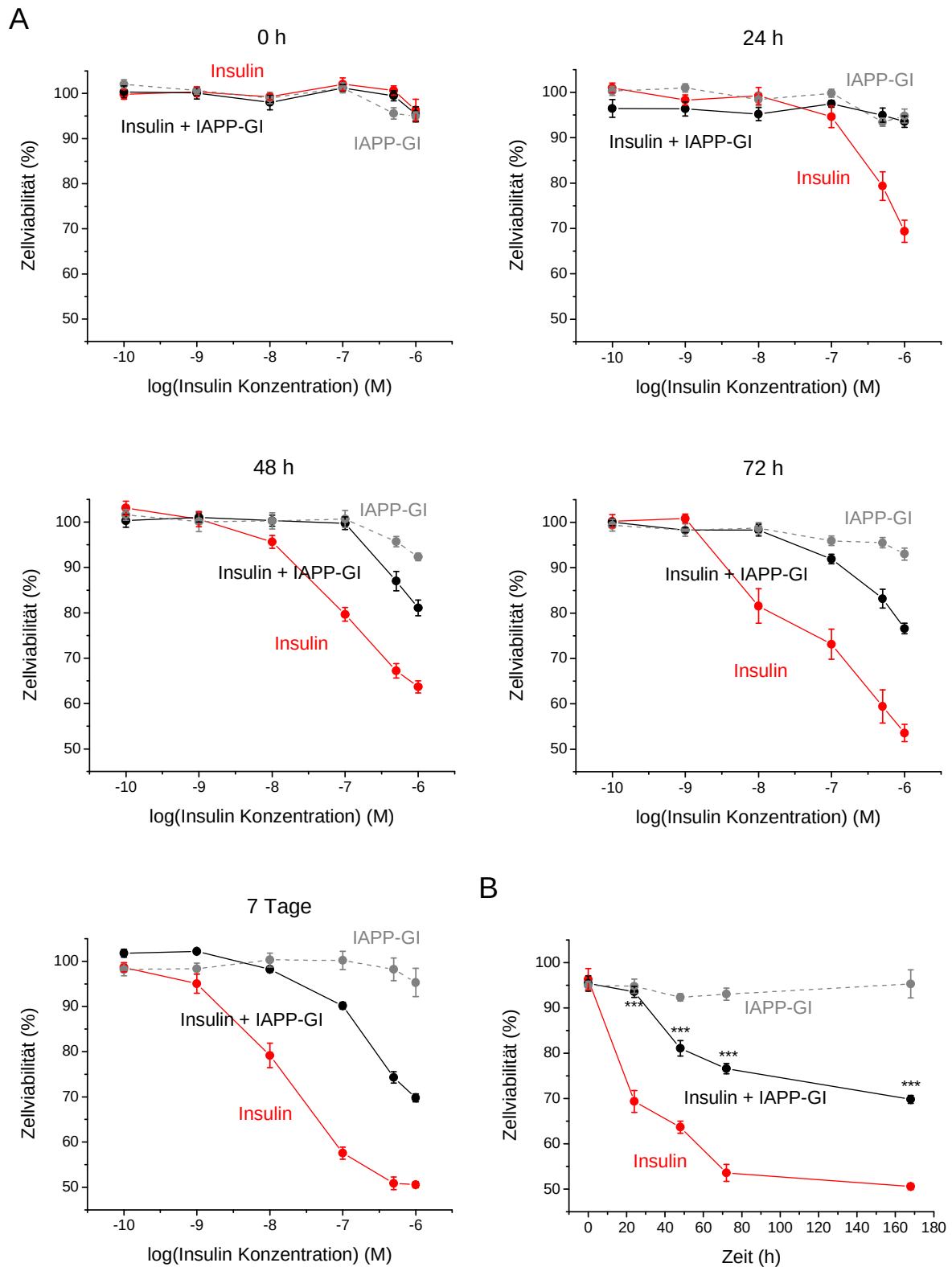


Abbildung 3.26: Inhibierung der zytotoxischen Selbstassoziation von Insulin durch IAPP-GI.

(A) Untersuchung des inhibitorischen Effekts von IAPP-GI auf die zytotoxische Insulinaggregation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Lösungen (20 μ M Insulin, 200 μ M IAPP-GI und 1/10-Mischung; 0 h bis 7 Tage, in Wasser pH 2), gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays an RIN-Zellen. (B) Zusammenfassung der kinetischen Studie bei einer Insulinendkonzentration von 1 μ M auf den Zellen. Die Mittelwerte ($\pm$ SEM) wurden aus 3 Assays (je n = 3) berechnet (***) für p < 0,001, mit ANOVA).

Zusätzlich wurde Insulin (20 μM) mit unterschiedlichen Konzentrationen an IAPP-GI gemischt und die Lösungen wurden nach 24-stündiger Inkubation (pH 2, 60 $^{\circ}\text{C}$) auf RIN-Zellen gegeben. Die Daten sind bei einer finalen Insulinkonzentration von 100 nM auf RIN-Zellen in Abbildung 3.27 A dargestellt. Aus der Titrationskurve wurde ein IC_{50} -Wert von 205 nM für den inhibitorischen Effekt von IAPP-GI auf die Bildung von zelltoxischen Insulinaggregaten berechnet.

Der inhibitorische Effekt von IAPP-GI wurde auch bei einer 10-fach höheren Insulinkonzentration (200 μM) untersucht (Abbildung 3.27 B). Frisch gelöstes Insulin war auf RIN-Zellen nicht zytotoxisch. 24 h aggregiertes Insulin hatte, bei einer 2 μM Endkonzentration auf den Zellen, eine signifikante zelltoxische Wirkung. Die 1/1-Mischung mit IAPP-GI konnte die Toxizität von Insulin um ca. 15 % inhibieren.

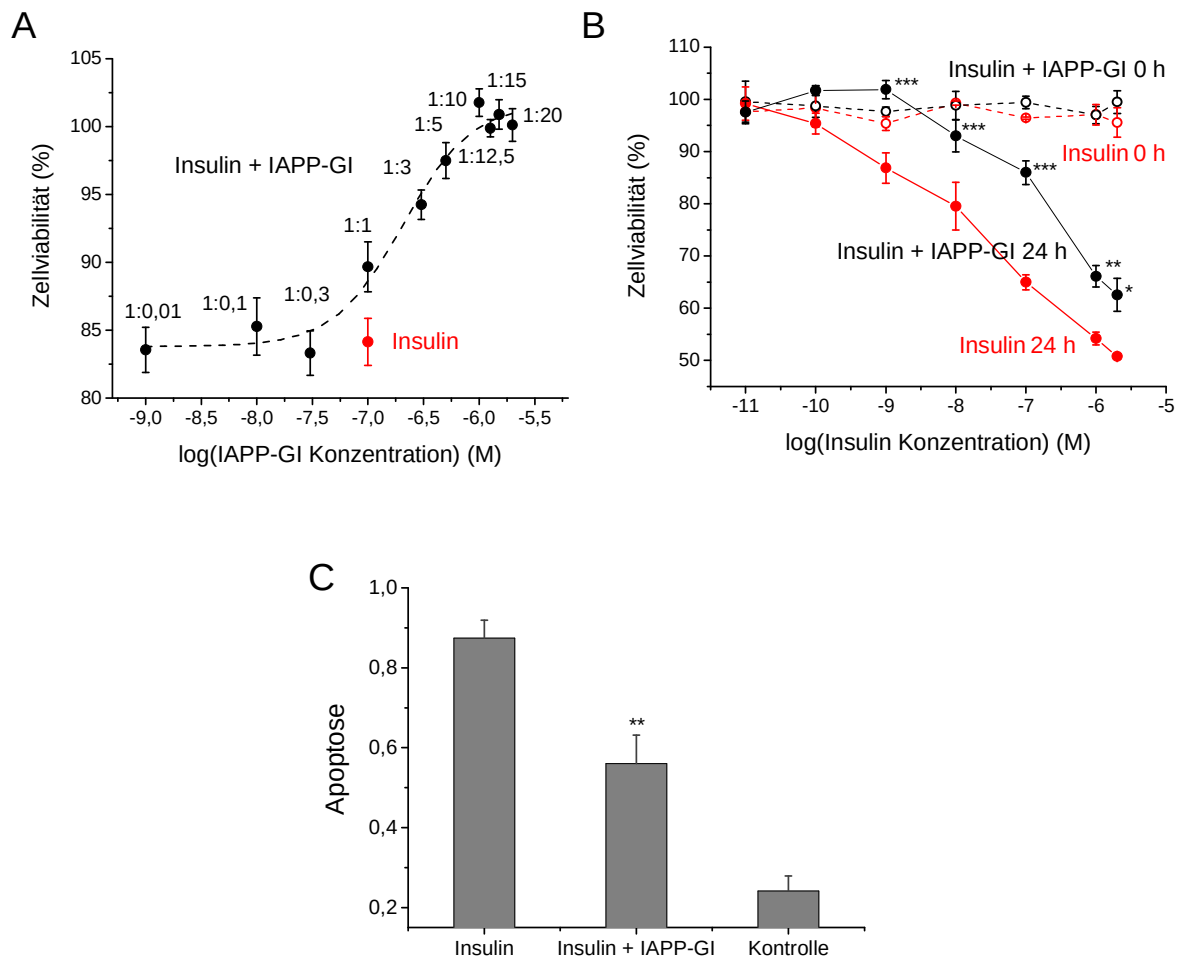


Abbildung 3.27: Blockierung der zytotoxischen Insulinaggregation durch IAPP-GI, gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays und Apoptose-Quantifizierungs-Assays. (A) MTT-Assay: Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Inhibition der Bildung toxischer Insulinaggregate auf RIN-Zellen durch IAPP-GI. Hierfür wurde 20 μM Insulin mit unterschiedlichen Konzentrationen an IAPP-GI (IAPP-GI/Insulin zwischen 1/0,01 – 1/20) in Wasser pH 2 bei 60 $^{\circ}\text{C}$ für 24 h inkubiert und anschließend zu den RIN-Zellen dazugegeben. Die finale Konzentration von Insulin auf die Zellen betrug 100 nM. Anhand der Titrationskurve wurde ein IC_{50} -Wert von 205 nM berechnet. (B) Toxische Wirkung einer 200 μM gealterten Insulinlösung und Inhibition durch IAPP-GI (1/1-Mischung in H_2O , pH 2), gemessen bei $t = 0$ und nach 24-stündiger Inkubation der Lösungen bei

60°C mittels MTT-Reduktionsassay. (C) Inhibition der durch Insulinaggregate induzierten Apoptose auf RIN-Zellen durch IAPP-GI. 10 µM Insulin und eine 1/10 Mischung mit IAPP-GI wurden in Wasser pH 2 für 72 h bei 60 °C inkubiert und danach zu RIN-Zellen pipettiert (finale Insulinkonzentration auf Zellen: 1 µM). Alle Daten sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus 3 Assays (je $n = 3$; * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$; mit ANOVA).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die zytotoxischen Insulinaggregate einen apoptotischen Zelltod induzieren können. Insulin (20 µM) und eine 1/10-Mischung mit IAPP-GI wurden bei einem pH-Wert von 2 für 72 h bei 60 °C vorinkubiert und, nach dem Neutralisieren der Inkubationslösungen mit Zellkulturmedium, auf RIN-Zellen gegeben. Die im Verlauf der Apoptose gebildeten Histon-assoziierten Nukleosomen wurden mittels eines ELISAs gemessen. Die Eigenschaft von IAPP-GI, die Zellen vor dem Insulin-induzierten Zelltod zu schützen, wurde auch mit diesem Assay bestätigt (Abbildung 3.27 C).

Da IAPP die Fibrillenbildung von Insulin teilweise inhibieren konnte (Abbildung 3.24 C), wurde als nächstes der Einfluss von IAPP auf die zytotoxische Insulinaggregation untersucht (Abbildung 3.28 A und B). Frisch gelöstes IAPP allein (200 µM) bildete unter diesen Versuchsbedingungen (pH-Wert 2) bereits ohne eine Vorinkubation der Lösung toxische Spezies. Insulin allein hatte bei $t = 0$ noch keine toxische Wirkung auf RIN-Zellen. Dagegen konnte die 1/10 Insulin/IAPP-Mischung aufgrund der Toxizität von IAPP, ohne eine Vorinkubation der Lösung, den Zelltod induzieren (Abbildung 3.28 A). Nach 24-stündiger Inkubation stieg die Toxizität der IAPP-Lösung und der 1/10 IAPP/Insulin-Mischung weiter an; der toxische Effekt von Insulin war am geringsten (Abbildung 3.28 B). Die Toxizität der IAPP/Insulin-Mischung war jedoch geringer als die der IAPP-Inkubation. Anhand dieser Daten ist zu erkennen, dass Insulin die IAPP-Aggregation zu toxischen Spezies teilweise unterdrücken kann. Dieser Befund war im Einklang mit den Daten, dass Insulin die IAPP-Fibrillenbildung unterdrücken kann (Abbildung 3.24 C) [61]. Um den Effekt von Insulin auf die Umwandlung von nicht-toxischen IAPP-Spezies in toxische Aggregate zu untersuchen, wurde die IAPP/Insulin-Mischung bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert (Abbildung 3.28 C). Unter dieser Versuchsbedingung war IAPP bei $t = 0$ und Insulin nach 24-stündiger Inkubation bei 25 °C nicht toxisch. Nach 24 h waren in der IAPP-Lösung bereits toxische Spezies vorhanden. Die Bildung solcher Spezies wurde durch einen 2-fach molaren Überschuss an Insulin stark unterdrückt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Mischung von nicht-toxischen IAPP- und Insulin-Spezies die zytotoxische IAPP-Selbstassoziation gehemmt werden kann.

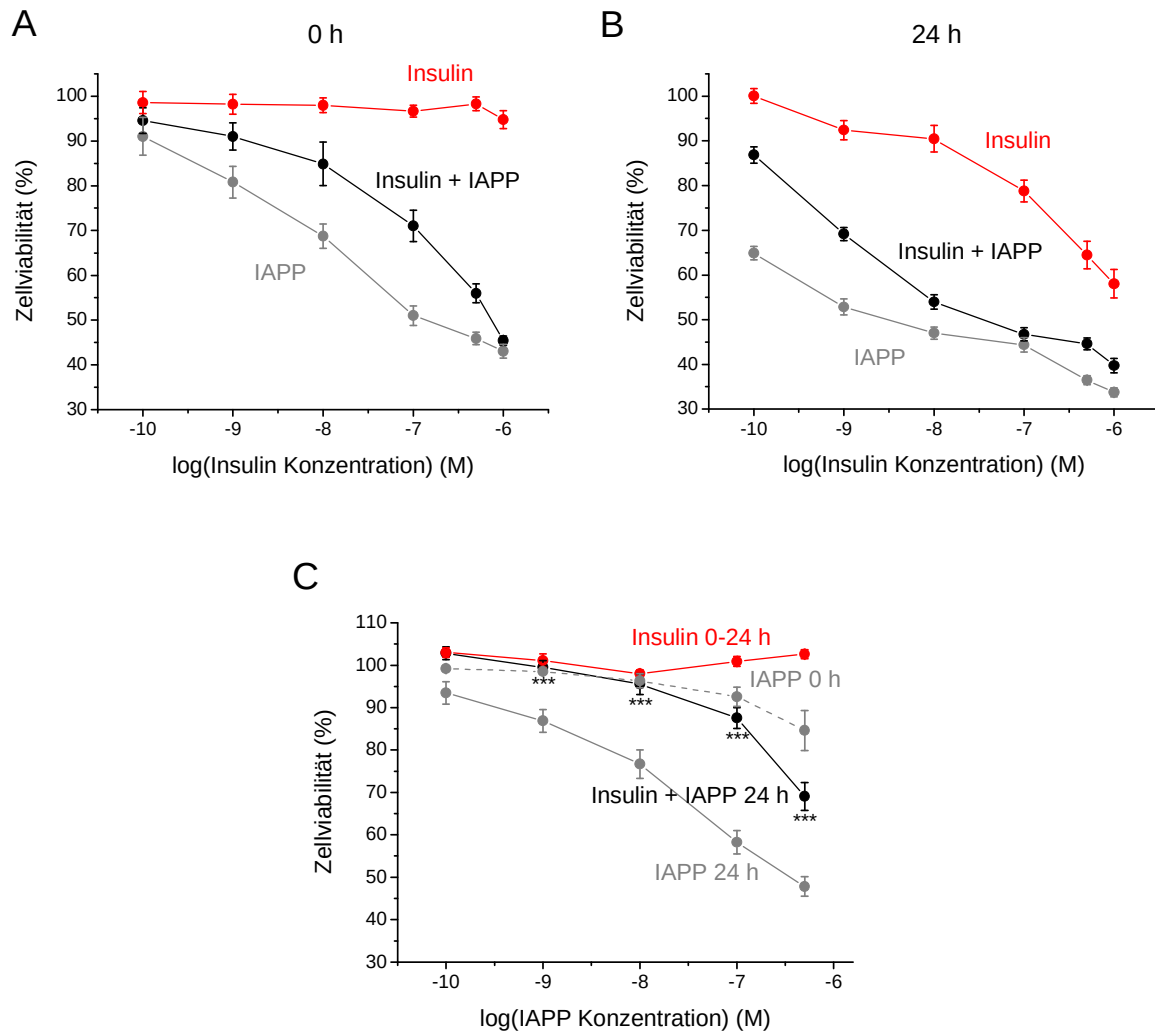


Abbildung 3.28: Hemmung der zytotoxischen IAPP-Selbstassoziation durch Insulin, gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays. (A, B) Toxizität von frisch gelöstem IAPP (200 μ M) induziert durch die Inkubationsbedingungen der *in vitro*-Fibrillogenese von Insulin (pH 2; 60 $^{\circ}$ C; 0-24 h) und Inhibition der Bildung zytotoxischer IAPP-Spezies durch Insulin (20 μ M). (C) Bildung toxischer IAPP-Spezies unter pH 7,4-Bedingungen (16,5 μ M in 50 mM Natriumphosphatpuffer, 100 mM NaCl, pH 7,4, 0,5 % HFIP; 25 $^{\circ}$ C; 0-24 h) und Blockierung durch 2-fachen Überschuss von Insulin, welches unter diesen Bedingungen in einem nicht-toxischen Zustand vorlag. Die Mittelwerte ($\pm$ SEM) wurden aus 3 Assays (je $n = 3$) berechnet (***) für $p < 0,001$, mit ANOVA).

Als nächstes wurde der Effekt von IAPP-FA und IAPP-AL untersucht. Es stellte sich heraus, dass diese zwei IAPP-Analoga, im Gegensatz zu IAPP-GI, nach einer 24-stündigen Inkubation bei pH 2 und 60 °C zytotoxische Spezies gebildet hatten (Abbildung 3.29 A und B). Daher hatten IAPP-FA und IAPP-AL keine inhibitorische Wirkung auf die Toxizität der Insulin/IAPP-Analoga-Mischungen, welche ähnlich zytotoxisch wie Insulin bzw. die Analoga alleine waren.

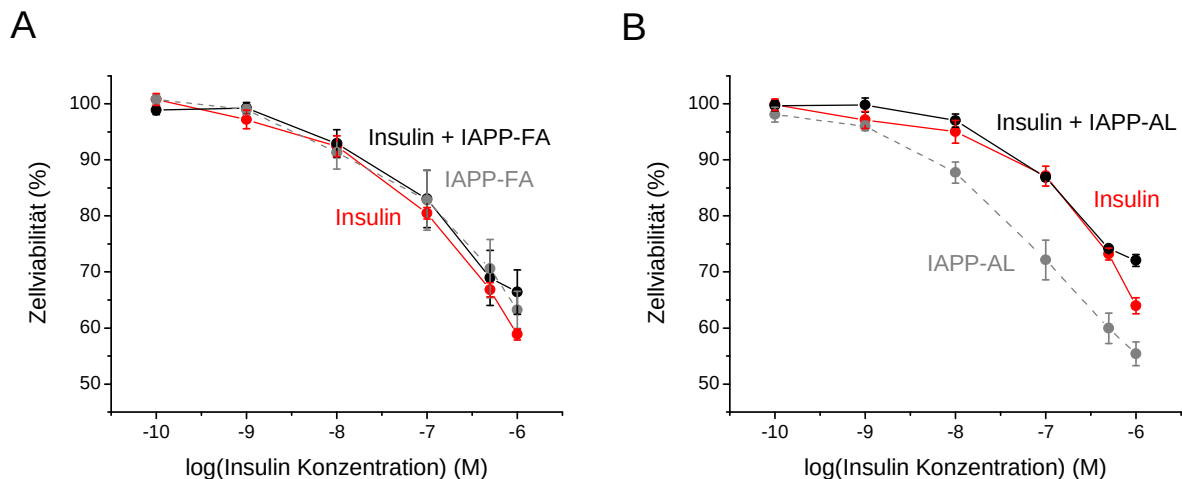
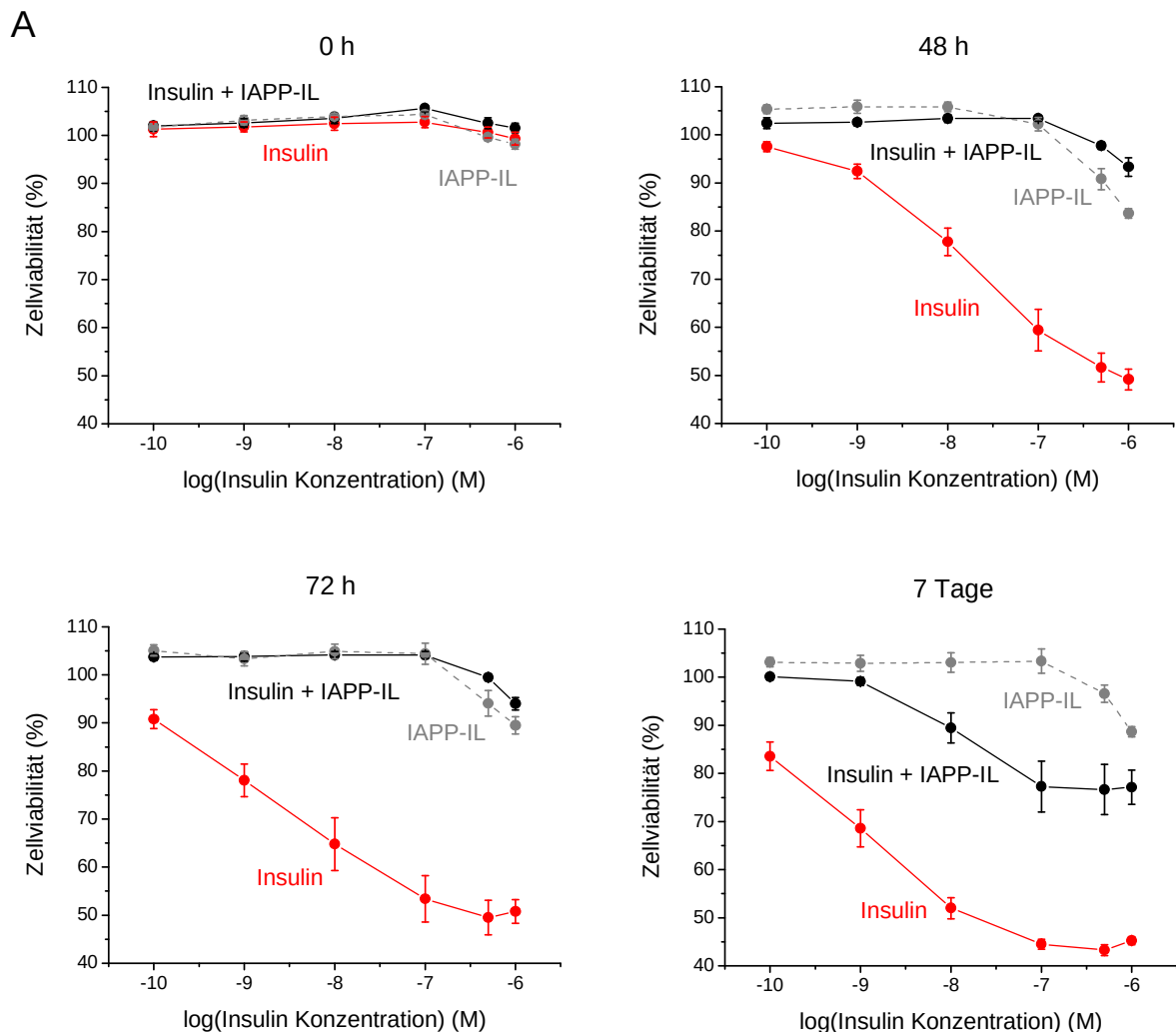


Abbildung 3.29: Untersuchung der Effekte von IAPP-FA und IAPP-AL auf die Bildung toxischer Insulinspezies gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays. Die Versuchsbedingungen der *in vitro*-Fibrillogenese von Insulin (pH 2, 60 °C) führten bei IAPP-FA (200 µM) und IAPP-AL (200 µM) zur Ausbildung von toxischen Konformationen, welche die toxische Wirkung von Insulin (20 µM) nicht beeinflussten. Die Konzentration von IAPP-FA und IAPP-AL allein ist zehnmals höher als die angegebenen Werte für Insulin auf der X-Achse der Graphen. Die Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 3 Assays (je n=3).

Im Anschluss daran wurde die Wirkung von IAPP-IL und rIAPP auf die toxische Insulinaggregation untersucht. Obwohl diese zwei Peptide, im Gegensatz zu IAPP-GI, die Fibrillenbildung von Insulin nur teilweise inhibieren konnten (Abbildung 3.25 C und D), zeigten Vorversuche, dass diese zwei IAPP-Analoga ähnlich wie IAPP-GI die zytotoxische Selbstassoziation von Insulin blockieren können. Um die Wirkung dieser Peptide mit dem inhibitorischen Effekt von IAPP-GI vergleichen zu können, wurde der Einfluss dieser Peptide auf die zytotoxische Insulinaggregation ebenfalls in einem Zeitraum von 0 h bis 7 Tagen untersucht. Die Kinetik zeigte, dass IAPP-IL nach 72-stündiger Inkubation der Lösungen (pH 2, 60 °C) die Bildung toxischer Insulinaggregate immer noch vollständig blockieren kann (Abbildung 3.30 A). Nach 7 Tagen ist der inhibitorische Effekt von IAPP-IL immer noch deutlich zu sehen. Die Ergebnisse der kinetischen Studie der Inhibierung der Bildung toxischer Insulinspezies durch IAPP-IL sind in Abbildung 3.30 B zusammengefasst. Die Zellvitalität wurde bei einer Insulinkonzentration von 1 µM (final auf die Zellen) gegen die Zeit aufgetragen. Die Unterdrückung der Insulinaggregation zu toxischen Spezies ist deutlich zu

sehen. Dabei wies IAPP-IL nur bei hohen Konzentrationen ($>10 \mu\text{M}$) und nach längeren Inkubationszeiten (bei pH 2) eine geringe zytotoxische Wirkung auf.

Die kinetische Studie mit rIAPP zeigte, dass die Ausbildung von toxischen Insulinaggregaten nur innerhalb einer 24-stündigen Inkubation (pH 2, 60°C) durch rIAPP unterdrückt werden kann (Abbildung 3.31 A). Nach 48 h war die Zelltoxizität der Insulin/rIAPP-Mischung höher als die des Insulins, obwohl rIAPP keine toxischen Spezies während der Inkubationszeit gebildet hatte. Diese Daten deuten darauf hin, dass durch die Wechselwirkung mit rIAPP die Insulinaggregation zu toxischen Spezies nach einer Inkubationszeit von 48 h gefördert wird. Die Daten dieser Kinetik sind in Abbildung 3.31 B zusammengefasst. Hierfür wurde die Vitalität der Zellen bei einer Insulinkonzentration von $1 \mu\text{M}$ gegen die Inkubationszeit aufgetragen.



B

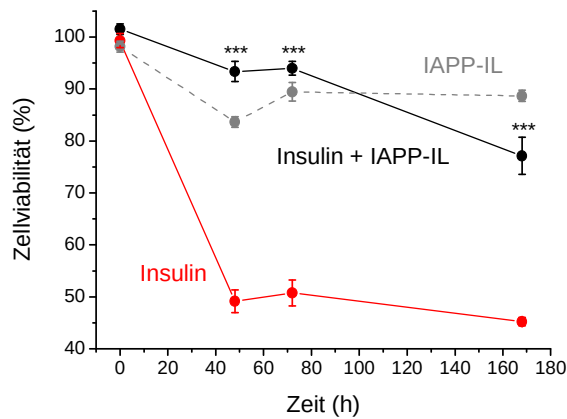


Abbildung 3.30: Inhibierung der zytotoxischen Selbstassoziation von Insulin durch IAPP-IL, gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays. Untersuchung des inhibitorischen Effekts von IAPP-IL auf die zytotoxische Insulinaggregation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Lösungen (20 μ M Insulin, 200 μ M IAPP-IL und 1/10-Mischung; 0 h bis 7 Tage). Die Konzentration von IAPP-IL allein ist zehnmal höher als die angegebenen Werte für Insulin auf der X-Achse der Graphen. (B) Zusammenfassung der kinetischen Studien durch die Darstellung der Zellvitalität, bei einer finalen Insulinkonzentration von 1 μ M, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Mittelwerte ($\pm$ SEM) wurden aus 3 Assays (je $n = 3$) berechnet (***) für $p < 0,001$, mit ANOVA).

A

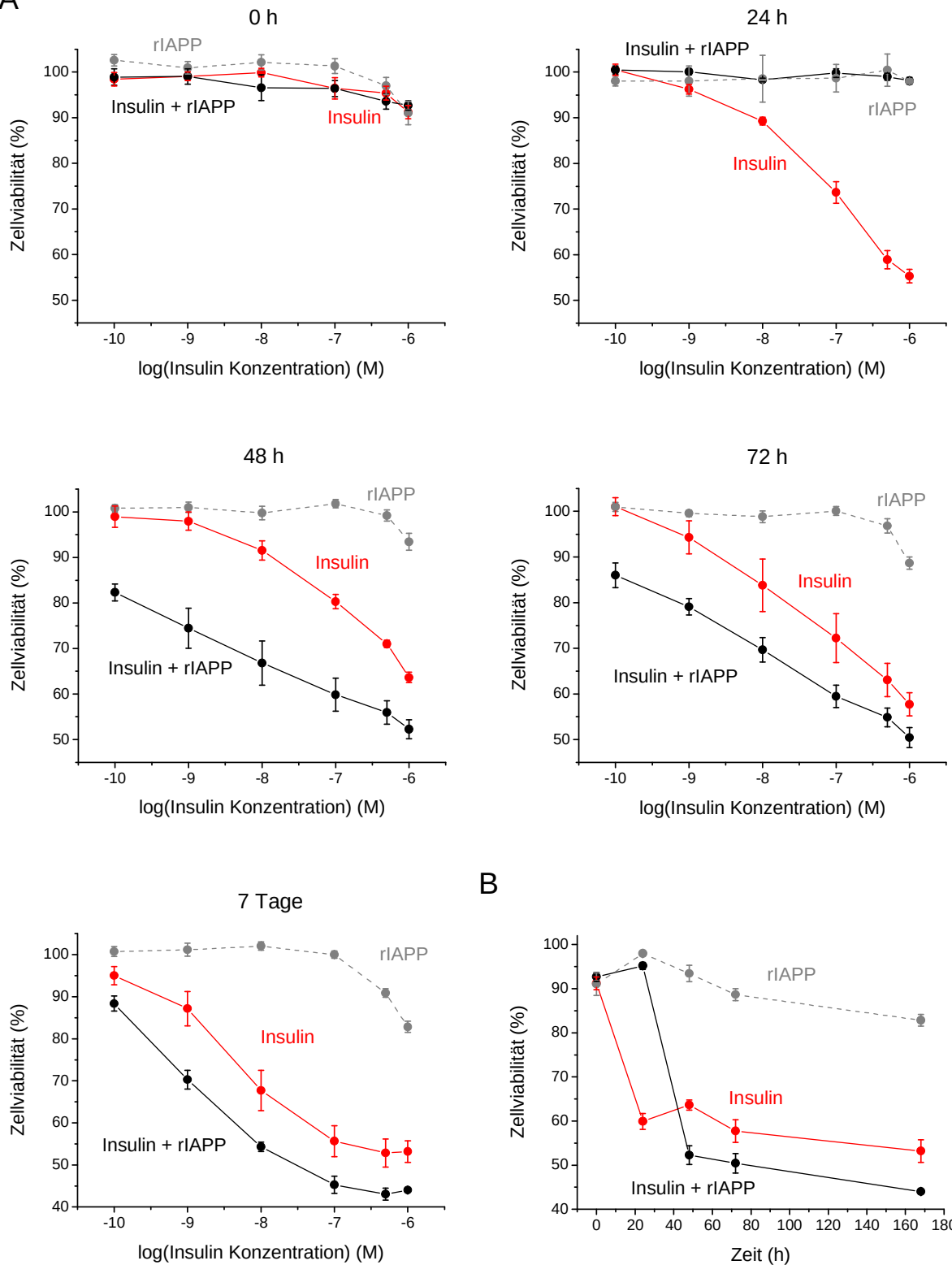


Abbildung 3.31: Inhibierung der zytotoxischen Selbstassoziation von Insulin durch rIAPP, gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays. Untersuchung des inhibitorischen Effekts von rIAPP auf die zytotoxische Insulinaggregation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Lösungen (20 μ M Insulin, 200 μ M rIAPP und 1/10-Mischung; 0 h bis 7 Tage). Die Konzentration von rIAPP allein ist zehnmals höher als die angegebenen Werte für Insulin auf der X-Achse der Graphen. (B) Zusammenfassung der

kinetischen Studien durch die Darstellung der Zellvitalität, bei einer finalen Insulinkonzentration von 1 μM , in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Mittelwerte ($\pm$ SEM) wurden aus 3 Assays (je $n = 3$) berechnet.

Des Weiteren wurde der Effekt des IAPP-Aggregationsinhibitors NFGAIL-GI untersucht. Es stellte sich heraus, dass, NFGAIL-GI, im Gegensatz zu IAPP-GI, bei einem 10-fachen Überschuss und nach einer 24-stündigen Inkubation bei 60 $^{\circ}\text{C}$, die Bildung zelltoxischer Insulinaggregate nicht inhibieren konnte (Abbildung 3.32 A). Zusätzlich wurde die Wirkung des Parathyroidhormons (PTH) untersucht, welches bereits bei der Inhibition der Insulin-Fibrillenbildung als Negativkontrolle verwendet wurde. PTH zeigte auch hier (10-facher Überschuss, pH 2, 60 $^{\circ}\text{C}$, 24 h) keinen Einfluss auf die zytotoxische Selbstassoziation von Insulin (Abbildung 3.32 B).

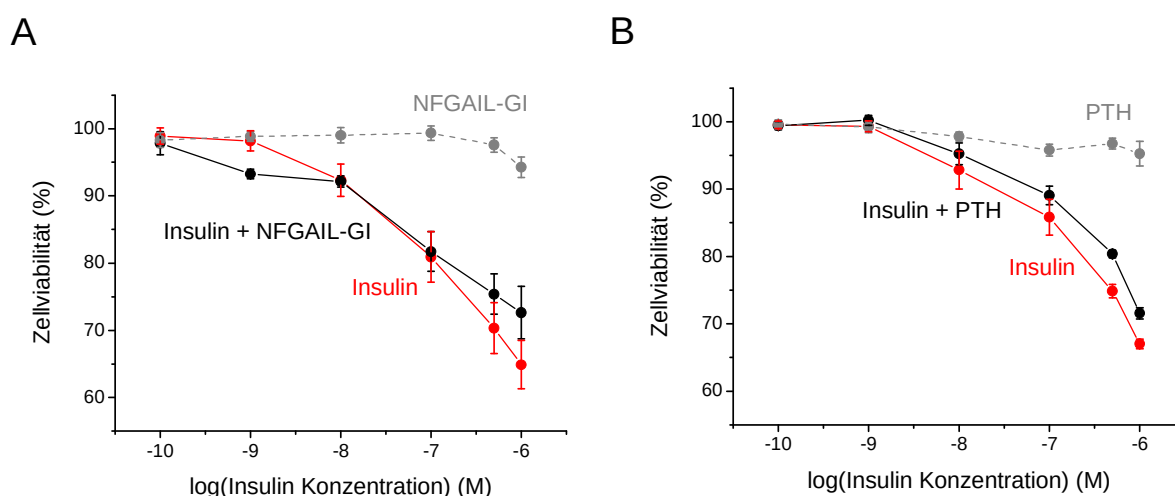


Abbildung 3.32: Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von NFGAIL-GI und des Parathyroidhormons (PTH) auf die toxische Insulinaggregation, gemessen mithilfe des MTT-Reduktionsassays. Die Peptide (200 μM) wurden jeweils mit 20 μM Insulin in Wasser pH 2 bei 60 $^{\circ}\text{C}$ für 24 h inkubiert. (A) Einfluss des NFGAIL-GI (10-facher Überschuss) auf die toxische Insulinaggregation. (B) Parathyroidhormon als Negativkontrolle in 10-fachem Überschuss mit Insulin. Die Konzentration von NFGAIL-GI und PTH allein ist zehnmal höher als die angegebenen Werte für Insulin auf der X-Achse der Graphen. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus 3 Assays (je $n=3$).

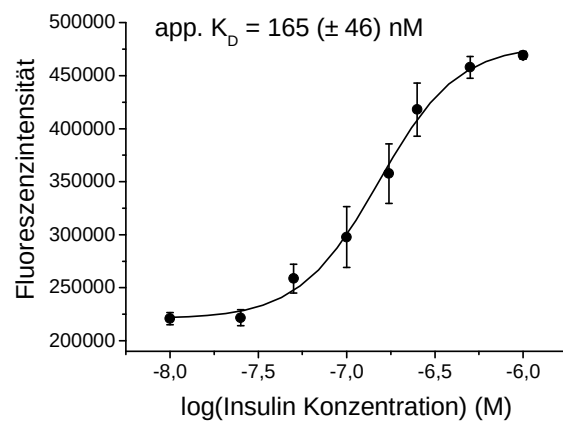
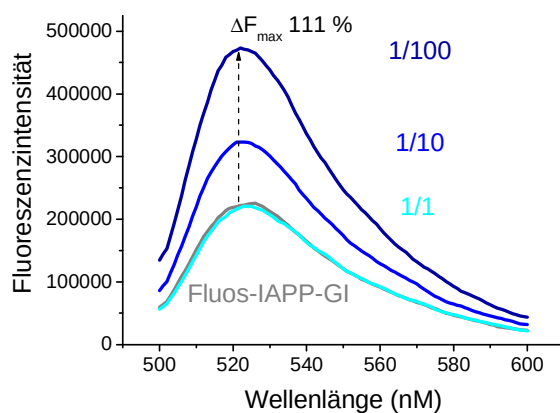
3.4.3 Bindungsstudien mittels Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektroskopie

Die Wechselwirkung von Insulin mit IAPP und den IAPP-Analoga wurde mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. N $^{\alpha}$ -aminoterminal mit Fluorescein markiertes IAPP, IAPP-GI, IAPP-FA, IAPP-AL, IAPP-IL und rIAPP (10 nM) wurden mit Insulin (in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP) titriert. Bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm wurden die Fluoreszenzemissionsspektren zwischen 500-600 nm aufgenommen. Durch die Interaktion der Peptide nahm die Emission des Fluorescein-markierten Peptids in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration zu. Anhand der sigmoidalen Bindungskurven – Auftragung der Fluoreszenzmessung bei 522 nm gegen die Insulinkonzentration – wurden die

Dissoziationskonstanten (app. K_D) berechnet (siehe Kapitel 2.5.2). Die Daten dieser Bindungsstudie zeigen, dass alle IAPP-Analoga mit Insulin in einem nanomolaren Bereich wechselwirken (Abbildung 3.33 A-E). Mit einer app. K_D von 32 nM hat IAPP-IL die höchste Affinität zu Insulin. Bindungsstudien mit 1 nM Fluos-IAPP-GI bzw. Fluos-IAPP haben zu ähnlichen Dissoziationskonstanten geführt (app. K_D 100 bzw. 142), wie bei den Messungen mit 10 nM an Fluorescein-markierten Peptide. Da IAPP und IAPP-GI bei 10 nM aggregiert sind, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Stärke der Bindung zu Insulin nicht signifikant vom Assoziationsstatus des IAPP bzw. IAPP-GI (zwischen 1-10 nM) abhängig ist.

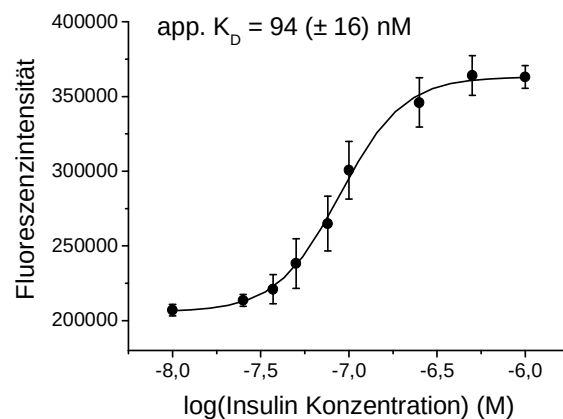
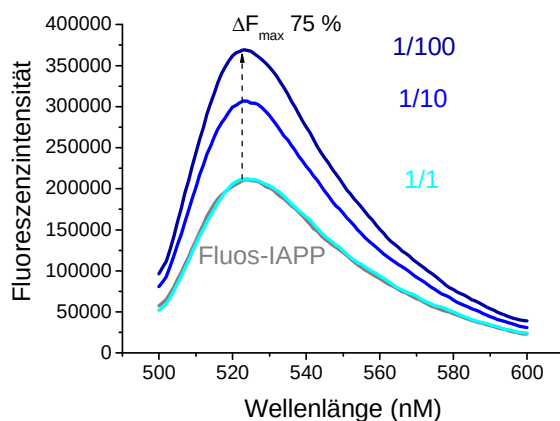
A

Fluos-IAPP-GI 10 nM + Insulin

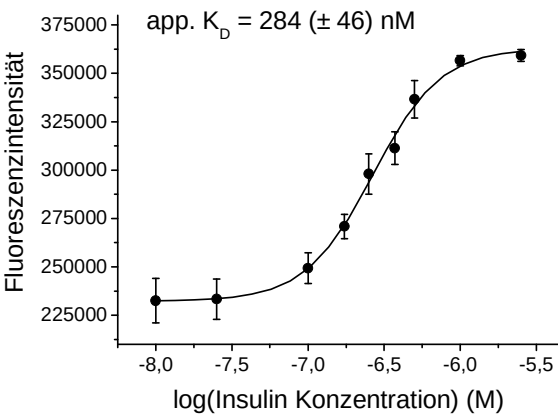
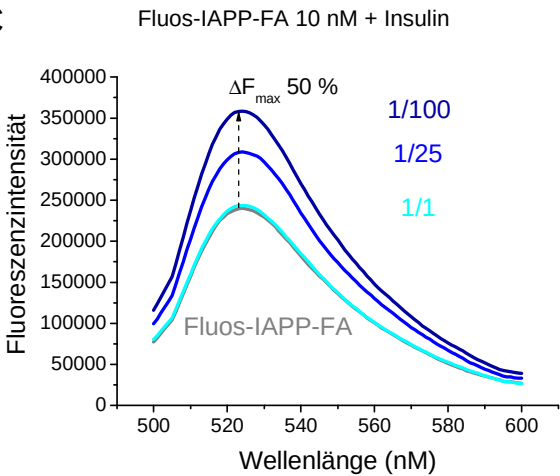


B

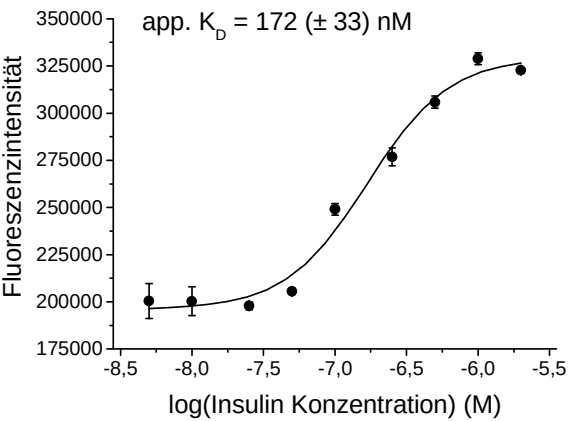
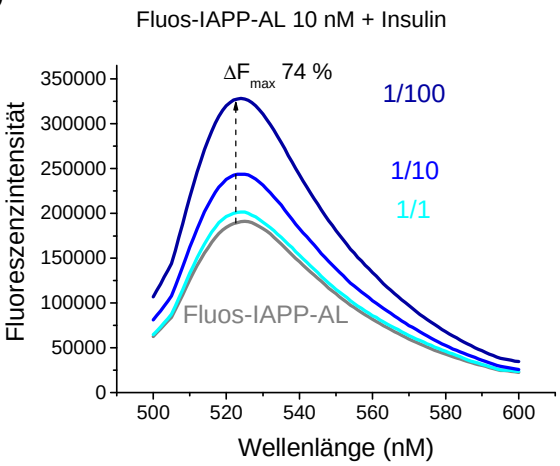
Fluos-IAPP 10 nM + Insulin



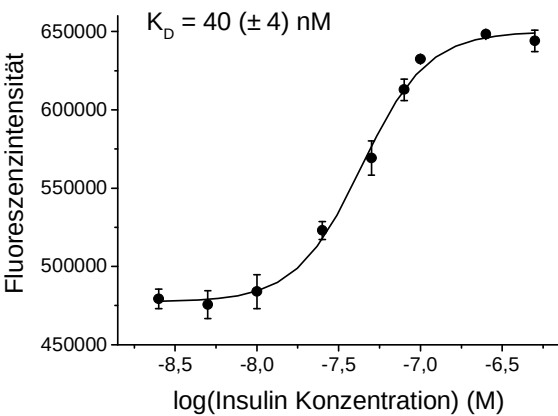
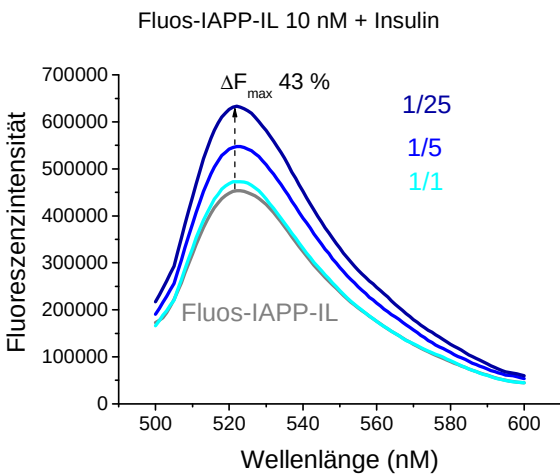
C



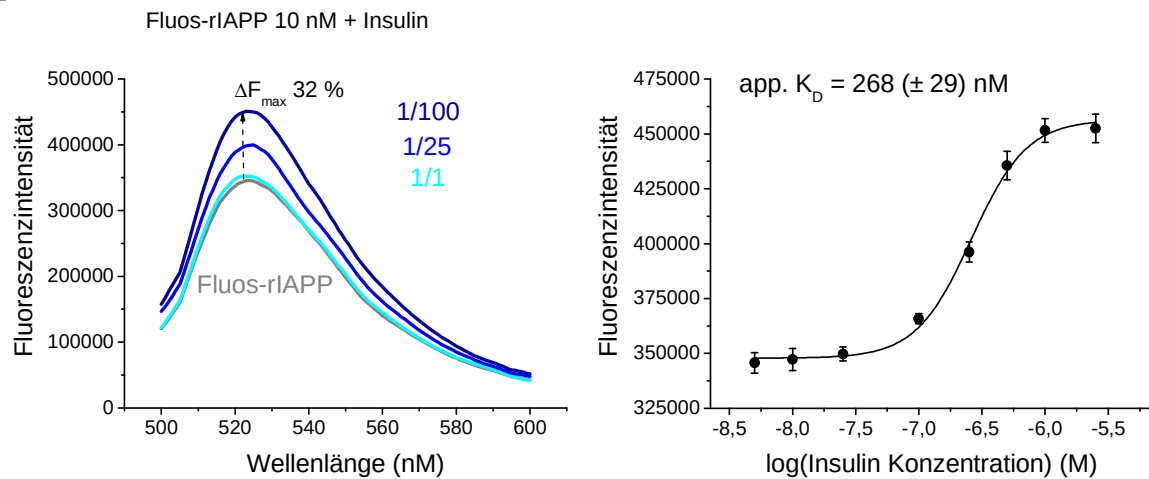
D



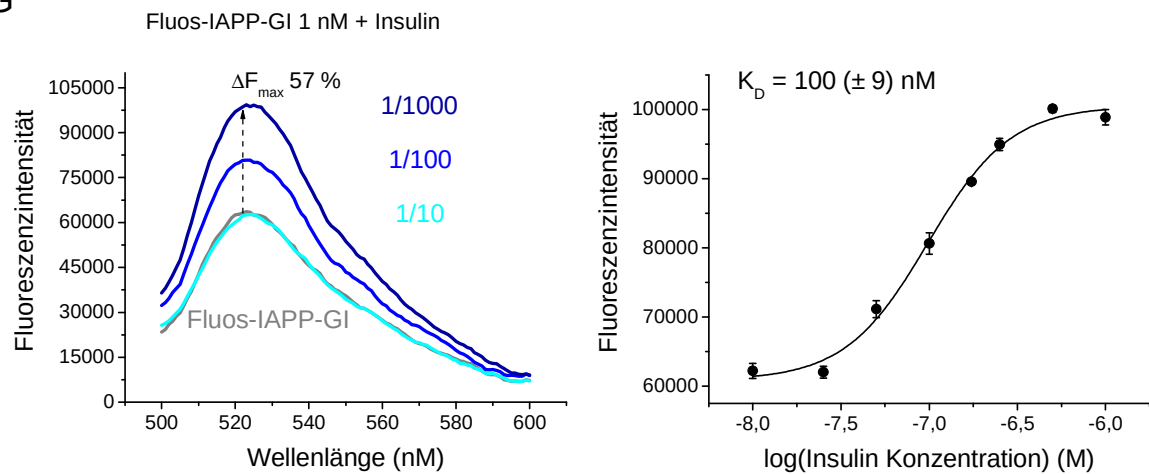
E



F



G



H

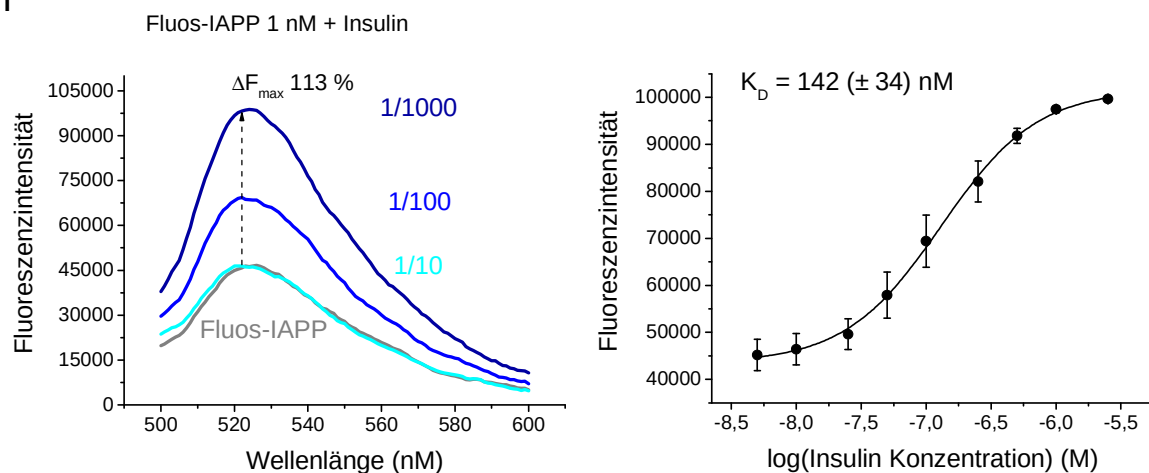
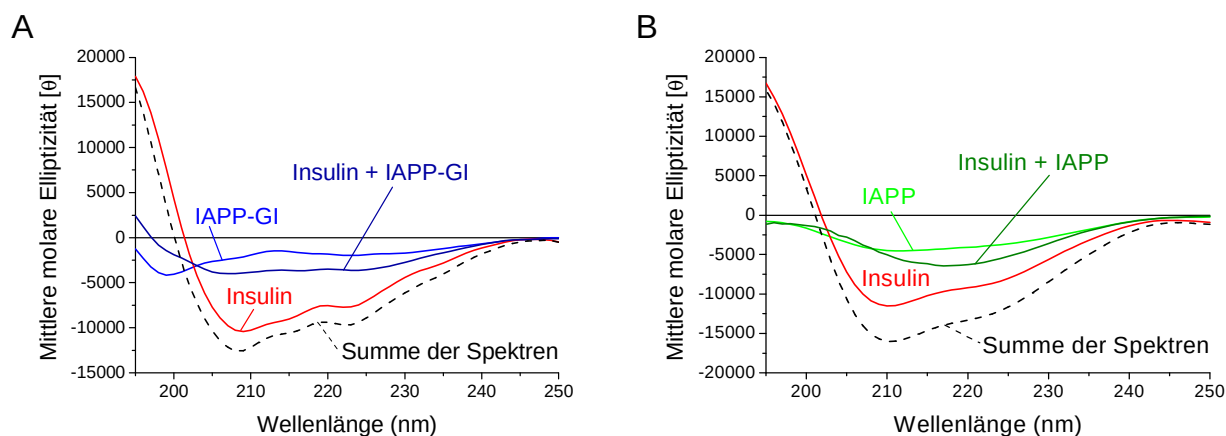


Abbildung 3.33: Heteroassoziation von IAPP und der IAPP-Analoga mit Insulin, gemessen mittels Fluoreszenzspektroskopie. 10 nM Fluos-IAPP-GI (A) Fluos-IAPP (B), Fluos-IAPP-FA (C), Fluos-IAPP-AL (D), Fluos-IAPP-IL (E) oder Fluos-rIAPP (F) wurden mit Insulin in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1 % HFIP titriert. Zusätzlich wurde 1 nM Fluos-IAPP-GI (G) bzw. Fluos-IAPP (H) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Insulin gemischt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Links in der Abbildung sind die Emissionsspektren (500-600 nm) und die maximale Fluoreszenzerhöhung bei einem entsprechenden Überschuss an Insulin dargestellt. Das Hintergrundsignal des Puffers wurde von allen

Spektren abgezogen. Rechts sind die Bindungskurven (Fluoreszenzemission bei 522 nm in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration) und die berechneten apparenten Dissoziationskonstanten (app. K_D) zu sehen (Mittelwerte $\pm$ SEM aus $n = 3$ Messungen).

Zusätzlich wurde die Insulin/IAPP-GI- und Insulin/IAPP-Wechselwirkung mithilfe von Fern-UV-CD-Spektroskopie charakterisiert. Dabei deutete das CD-Spektrum von Insulin (20 μ M) bei einem pH-Wert von 2 (25 $^{\circ}$ C), aufgrund der zwei Minima bei 207 und 222 nm, auf eine signifikante Menge an α -helikalen Anteilen hin (Abbildung 3.34). Dieses gemessene CD-Spektrum von Insulin entsprach den bereits in der Literatur publizierten Spektren, die ebenfalls unter sauren Bedingungen gemessen wurden. Das Spektrum von IAPP-GI (100 μ M) allein weist ein eindeutiges Minimum bei einer Wellenlänge um ca. 198 nm auf, was hauptsächlich für eine ungeordnete Konformation charakteristisch ist (Abbildung 3.34 A). Das Spektrum der Mischung (1/5) deutete auf die Bildung geordneter Heterokomplexe hin, die einen geringeren Anteil an helikaler Struktur aufweisen als Insulin allein. Zusätzlich ist aus den Messungen ersichtlich, dass sich die mathematische Summe der Spektren der einzelnen Komponenten deutlich von dem CD-Spektrum der Insulin/IAPP-GI-Mischung unterscheidet, was auf die Wechselwirkung der Peptide zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu dem Spektrum der Insulin/IAPP-GI-Mischung wies das CD-Spektrum der Insulin/IAPP-Mischung (1/5) nur ein Minimum bei 217 nm auf (Abbildung 3.34 B). Dies deutete auf das Vorhandensein signifikanter Anteile an β -Faltblattstruktur in der Insulin/IAPP-Mischung hin. Auch IAPP allein zeigte zwischen 210 und 220 nm eine negative CD-Bande, was auch für erhöhte β -Faltblattanteile spricht. Die Spektren von IAPP-GI, IAPP und der zwei Mischungen mit Insulin sind in Abbildung 3.34 C nochmals zum Vergleich der unterschiedlichen Sekundärstrukturen zusammengestellt. Daraus wird ersichtlich, dass IAPP-GI mit Insulin zu Heterokomplexen mit signifikanten Anteilen an α -helikaler Konformation assoziiert. Dagegen weisen die IAPP/Insulin-Komplexe eher erhöhte β -Faltblattsekundärstrukturanteile auf.



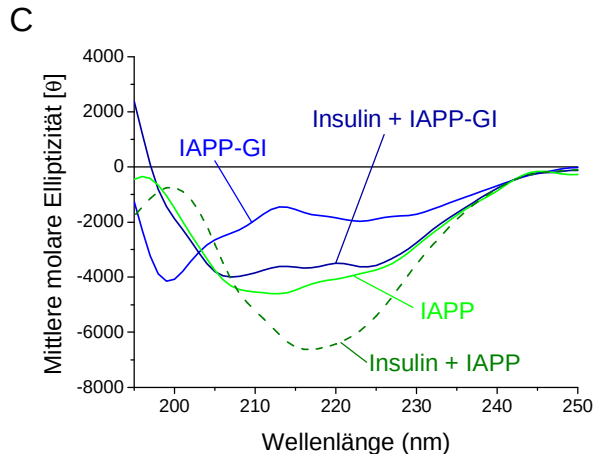


Abbildung 3.34: CD-Spektren der IAPP-GI/Insulin- und IAPP/Insulin-Heterokomplexe im Vergleich zu IAPP und IAPP-GI allein. (A, B) Die Fern-UV-CD-Spektren von Insulin (20 μM), IAPP-GI (100 μM), IAPP (100 μM) und der 1/5 Insulin/IAPP-GI- bzw. Insulin/IAPP-Mischung wurden in Wasser pH 2 bei 25 °C aufgenommen. Die Summe der Spektren ist die mathematische Addition der einzelnen Spektren von Insulin und IAPP-GI bzw. IAPP. (C) Zusammenstellung der CD-Spektren von IAPP-GI, IAPP und der zwei 1/5-Mischungen mit Insulin.

3.4.4 Nachweis der Insulin/IAPP-GI-Heterokomplexe durch Crosslinking

Zur Charakterisierung der IAPP-GI/Insulin-Heteroaggregate wurden die Komplexe durch Glutaraldehyd stabilisiert, danach elektrophoretisch aufgetrennt und durch Western-Blotting mittels einem anti-Insulin- und anti-IAPP-GI-Antikörper detektiert. Die zwei Aldehydgruppen des Crosslinkers können mit den Aminoseitengruppen der Lysin- und Arginin-Reste kovalente Bindungen ausbilden und somit verschiedene Moleküle bzw. verschiedene Einheiten eines Komplexes, die sich in räumlicher Nähe befinden, quervernetzen. Vor dem Crosslinking wurde Insulin mit IAPP-GI (1/5) zur Ausbildung der Heterokomplexe in Wasser pH 2 für 24 h bei 60 °C inkubiert.

In Abbildung 3.35 sind die Western-Blots dargestellt. Anhand des Proteinmarkers (3-52 kDA) und der Molekulargewichte (MW) der hier untersuchten Peptide, kann man Hinweise bekommen, welche Bande die einzelnen Peptide, ihre Oligomere oder die Heterokomplexe darstellt. In der 3. Spur (Insulin allein) des anti-Insulin Blots (Abbildung 3.35 links) ist quervernetztes Insulinmonomer (A + B-Kette) und in sehr kleinen Mengen das Insulindimer zu sehen. Als Input wurde frisch gelöstes Insulin (2 μg in Wasser pH 2) ohne die Zugabe von Glutaraldehyd verwendet (Spur 1). Die Banden der Insulin/IAPP-GI-Mischung sind in der 2. Spur zu sehen. Es wurden drei Banden detektiert. Die 1. Bande ist quervernetztes Insulinmonomer. Bei der 2. Bande könnte es sich um einen Komplex aus Insulin und IAPP-GI handeln. Bande Nr. 3 könnte ein Heterokomplex aus einem Insulindimer und IAPP-GI oder nur ein Insulindimer darstellen. Die 4. Spur beinhaltet IAPP-GI (2 μg), welches von dem anti-Insulin Antikörper nicht detektiert wird.

Die Bande in Spur 5 des anti-IAPP-GI Western-Blots (Abbildung 3.35 links) repräsentiert den IAPP-GI-Input (2 µg). In Spur 6 wurde Insulin (2 µg) aufgetragen, welches nicht durch den anti-IAPP-GI-Antikörper detektiert wurde. Spur 8 zeigt Mono- und Dimere, in sehr kleinen Mengen auch tri- und tetramere IAPP-GI-Oligomere. In der Insulin/IAPP-GI Mischung (Spur 7) wurde zusätzlich eine weitere Bande detektiert, die den bereits oben beschriebenen Heterokomplex aus Insulin und IAPP-GI darstellen könnte. Die Bande in Höhe des IAPP-GI-Dimers ist wesentlich dicker als die bei IAPP-GI allein. Hierbei könnte es sich um zwei Banden handeln, bestehend aus einem weiteren Heterokomplex (Insulindimer + IAPP-GI) und einem IAPP-GI-Dimer.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter diesen Versuchsbedingungen, das Insulinmonomer mit IAPP-GI ein Heterokomplex ausbilden kann. Dies ist die einzige zusätzlich Bande, die in der Insulin/IAPP-GI-Mischung durch den anti-IAPP Antikörper detektiert wurde. Diese Bande ist auch in der Mischung im anti-Insulin WB zu sehen.

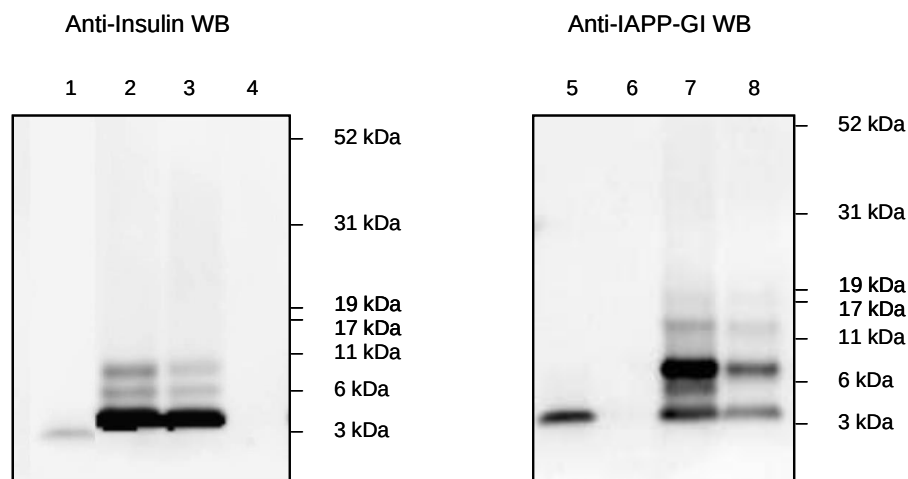


Abbildung 3.35: Untersuchung der Interaktion von Insulin und IAPP-GI mittels Quervernetzung durch Glutaraldehyd. Die Detektion der Peptide bzw. ihrer Heterokomplexe erfolgte mittels NuPAGE und Western-Blot-Analyse mithilfe eines anti-Insulin und anti-IAPP Antikörpers. 20 µM Insulin wurde mit 100 µM IAPP-GI in Wasser pH 2 für 24 h bei 60 °C inkubiert. Das Crosslinking erfolgte mit einer 25 %igen Glutardialdehyd-Lösung für 2 h bei 25 °C. Links: Western-Blot mit anti-Insulin Antikörper: (1) Insulin Input (2 µg), ohne Vernetzung und Inkubation; (2) 1/5-Mischung von Insulin mit IAPP-GI und (3) Insulin allein, nach Inkubation und Crosslinking. (4) IAPP-GI Input (2 µg), ohne Vernetzung und Inkubation. Rechts: Anti-IAPP-GI Western-Blot: (5) IAPP-GI Input (2 µg) wurde nicht inkubiert und nicht vernetzt; (6) Insulin Input (2 µg), ohne Vernetzung und Inkubation; (7) 1/5-Mischung von Insulin und IAPP-GI, die Probe wurden inkubiert und vernetzt; (8) IAPP-GI nach Inkubation und Quervernetzung. Die Western-Blots sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.4.5 Hemmung der nicht-fibrillären Insulin-Oligomerisierung durch IAPP-GI und IAPP

Die Insulinaggregation findet durch Dissoziations- und partielle Entfaltungsschritte statt [220, 258]. Bei pH 2 und 25 °C kommen hauptsächlich Monomere und Dimere des nativ-gefalteten Insulins vor. Bei höheren Temperaturen dissoziiert das Dimer und durch partielle Entfaltung entstehen fehlgefaltete Monomere die zu Oligomeren und Fibrillen aggregieren. Da IAPP-GI bzw. IAPP die Bildung von toxischen Insulinspezies und -fibrillen inhibieren bzw. abschwächen konnten, wurde nun untersucht, ob diese zwei Peptide einen Einfluss auf die Bildung nicht-fibrillärer Insulinaggregate haben könnten. Der kinetische Verlauf der Insulin-Oligomerisierung wurde mithilfe der nicht-reduzierenden NuPAGE-Elektrophorese in Kombination mit Western-Blots untersucht. Die Insulinlösung (20 µM) und 1/5-Mischungen mit IAPP-GI oder IAPP (frisch gelöst, nicht-fibrillär) wurden inkubiert (pH 2, 60 °C) und nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert (Abbildung 3.36 A). Frisch gelöstes Insulin ($t = 0$) bestand hauptsächlich aus Mono- und Dimeren, wobei nach 24 und 48 h signifikante Mengen an Oligo- und Multimeren gebildet wurden. Die Insulin/IAPP-GI-Mischung bestand jedoch nur aus Monomeren und Dimeren, was auf einen deutlichen Inhibierungseffekt von IAPP-GI auf die Bildung von Insulin-Oligomeren hingewiesen hat. In der Gegenwart von IAPP wurde die Bildung von Insulin-Oligomeren und -Multimeren auch inhibiert. Der Effekt von IAPP war jedoch deutlich schwächer als die Inhibierung von IAPP-GI. Die Insulin/IAPP-Mischung beinhaltete zusätzlich tri- und tetramere Insulin-Oligomere. Diese Untersuchungen zeigten, dass sowohl IAPP-GI als auch frisch gelöstes, nicht-fibrilläres IAPP die Selbstassoziation von Insulin zu nicht-fibrillären Oligomeren unterdrücken können.

Zusätzlich wurde der Effekt von IAPP-GI bei einer 1/1-Mischung mit Insulin untersucht. Anhand des Western-Blots in Abbildung 3.36 B ist zu sehen, dass hier die Unterdrückung der Insulin-Oligomerisierung deutlich schwächer ist, was auf eine Abhängigkeit von der IAPP-GI-Konzentration dieses Effektes hindeutet lässt. Das als Negativkontrolle verwendete Peptid Parathyroidhormon (PTH) zeigte keine Inhibierung der nicht-fibrillären Insulinaggregation, was auf eine Sequenzspezifität des Effektes hingewiesen hat (Abbildung 3.36 C).

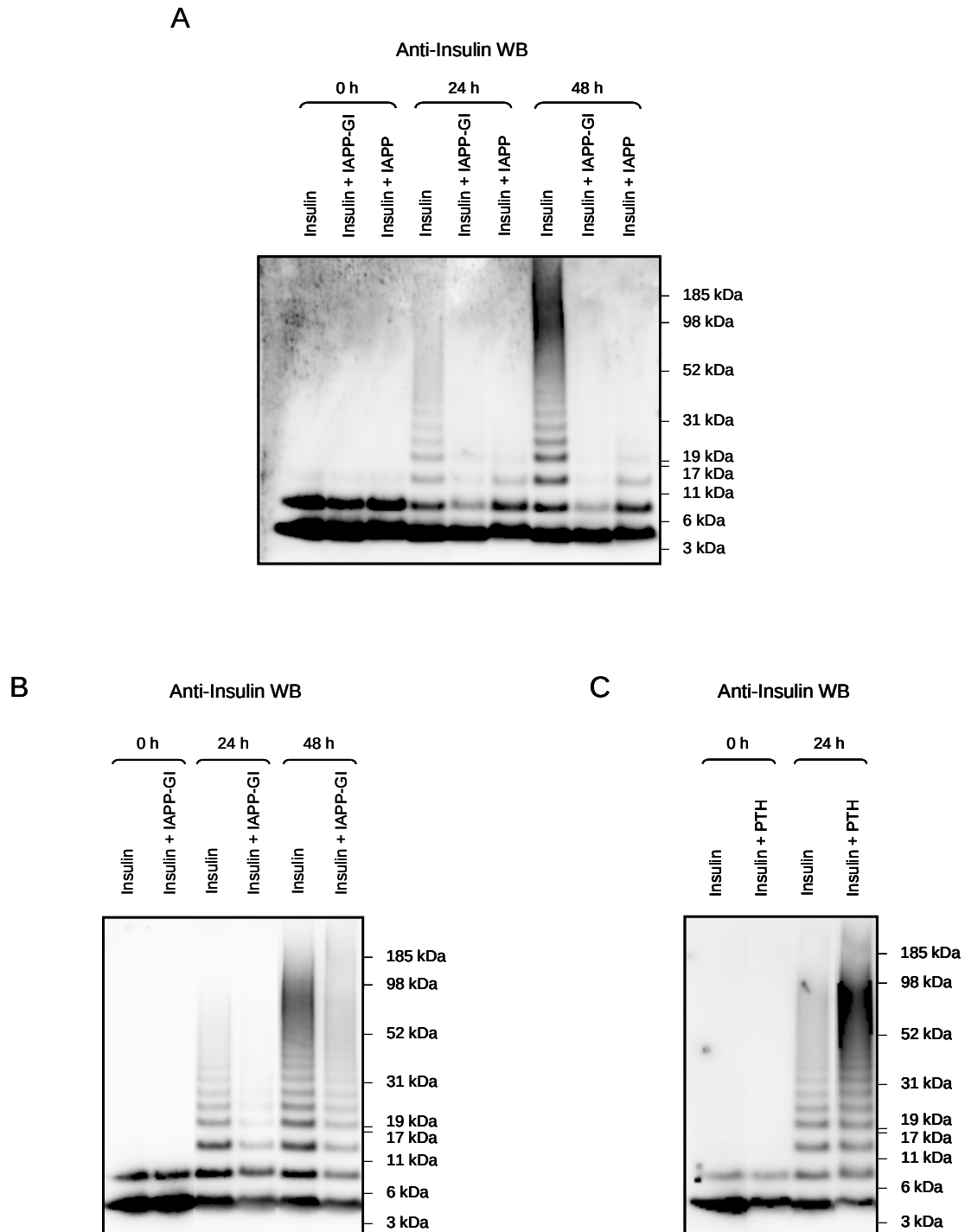


Abbildung 3.36: Untersuchung zur Inhibierung der nicht-fibrillären Insulin-Oligomerisierung, detektiert durch nicht-reduzierender NuPAGE Elektrophorese und Western-Blot-Analyse mittels anti-Insulin Antikörper (AK). Insulin (20 μ M) und 1/5-Mischungen mit IAPP-GI, IAPP (frisch gelöst, nicht fibrillär) und Parathyroidhormon (PTH) wurden in Wasser pH 2 bei 60 °C inkubiert. Bei $t = 0$ sowie nach 24 und 48 h wurden die Inkubationslösungen analysiert. (A) Western-Blot (WB) mit anti-Insulin AK von den Lösungen Insulin (20 μ M) und 1/5-Mischung mit IAPP-GI oder IAPP. (B) WB mit anti-Insulin AK einer 1/1 Insulin/IAPP-GI-Mischung und Insulin allein. (C) WB mit anti-Insulin AK von den Lösungen Insulin und einer Mischung mit PTH (5-facher Überschuss). Alle Western-Blots sind repräsentativ für $n = 3$ Experimente.

3.4.6 Auflösung der Insulinfibrillen und -oligomere durch IAPP-GI

Um die Frage zu beantworten, ob IAPP-GI nicht nur die toxische Aggregation von Insulin blockieren kann, sondern ob dieses IAPP-Analogon auch die Fähigkeit besitzt Insulinfibrillen und -Oligomere aufzulösen, wurden Insulinlösungen (10 μM) unter *in vitro*-Fibrillogenese-induzierende Bedingungen (pH 2, 60 $^{\circ}\text{C}$) 14 Tage inkubiert. Danach wurden sie mit 10-fachem Überschuss an IAPP-GI oder Parathyroidhormon (Kontrollpeptid) gemischt und die Fibrillenmenge wurde anschließend mithilfe des ThT-Bindungsassays bestimmt (Abbildung 3.37 A). Bereits direkt nach der Zugabe von IAPP-GI ($t = 0$) wurde eine deutlich niedrigere Fibrillenmenge als bei der Insulinlösung allein bestimmt. Die weiteren Bestimmungen deuteten darauf hin, dass IAPP-GI die Menge an Insulinfibrillen innerhalb 20 h um ca. 50 % reduzieren konnte. Dabei erwies sich, dass der Effekt des Parathyroidhormons (PTH) deutlich schwächer war (20 % Auflösung) als der Effekt von IAPP-GI, was auf eine Spezifität der fibrillenauflösenden Wirkung des IAPP-GI hingedeutet hat. Anschließend wurde untersucht, ob IAPP-GI auch noch in der Lage wäre, toxische Insulinspezies (Fibrillen und Aggregate) aufzulösen. Wie die Ergebnisse der unter Abbildung 3.37 B dargestellten MTT-Reduktionsassays zeigen, kann weder IAPP-GI (in 10-fachem Überschuss zu Insulin) noch PTH (1/10) bereits gebildete toxische Insulinspezies auflösen.

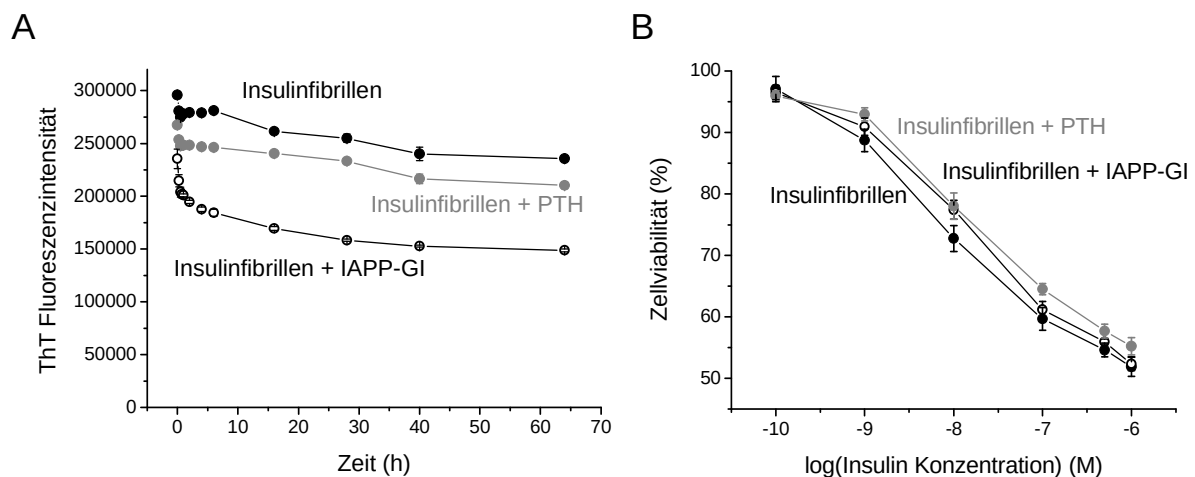


Abbildung 3.37: Untersuchung zur Auflösung der Insulinfibrillen durch IAPP-GI und Parathyroidhormon (PTH) mithilfe des ThT-Bindungsassays und MTT-Reduktionsassays. Zur Herstellung von Insulinfibrillen wurde 10 μM Insulin in Wasser pH 2 bei 60 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach 14 Tagen wurde IAPP-GI (100 μM) oder PTH (100 μM) dazugegeben. (A) ThT-Assay einer fibrillären Insulinlösung und 1/10-Mischungen aus Insulinfibrillen und IAPP-GI bzw. PTH. (B) MTT-Reduktionsassay einer fibrillären Insulinlösung und 1/10-Mischungen aus Insulinfibrillen und IAPP-GI bzw. PTH. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm$ SEM) aus 3 Assays (je $n=3$).

Da es nicht bekannt ist, ob die Toxizität der gealterten Insulinlösungen durch früh-gebildete Oligomere oder später-gebildete Fibrillen hervorgerufen wird, wurde anschließend der Effekt von IAPP-GI auf die Toxizität von früh-gebildeten Insulin-Oligomeren untersucht. Eine 24 h gealterte Insulinlösung (20 μ M, pH 2, 60 °C) wurde mit 10-fachem Überschuss an IAPP-GI gemischt und an verschiedenen Zeitpunkten mittels nicht-reduzierender NuPAGE-Elektrophorese und Western-Blot analysiert (Abbildung 3.38 A). Dabei stellte sich heraus, dass bereits bei $t = 0$ h in der Mischung das Insulindimer kaum detektierbar war. Zusätzlich wurde, im Vergleich zu Insulin allein, nach der Zugabe von IAPP-GI (0-24 h) ein stark reduzierter Anteil an monomerem Insulin gemessen. Des Weiteren war die Menge an Oligomere in der Insulin/IAPP-GI-Mischung bei $t = 0$ h und nach 3 h höher als bei Insulin alleine. Diese Daten deuten darauf hin, dass IAPP-GI das Insulindimer auflösen kann, und mit den entstandenen Monomeren zu Oligomeren und wahrscheinlich zu nicht detektierbaren höheren Molekülen aggregieren kann. Die Toxizität der Insulin-Oligomere konnte jedoch durch IAPP-GI (1/10) nicht beeinträchtigt werden (Abbildung 3.38 B).

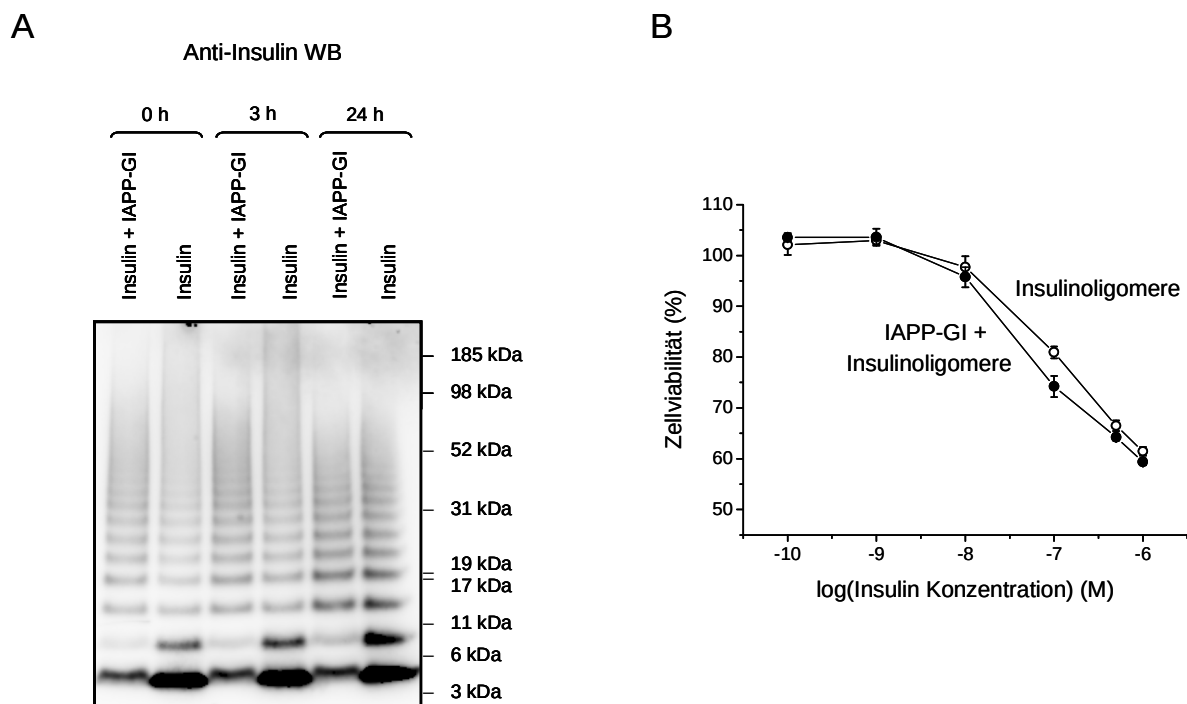
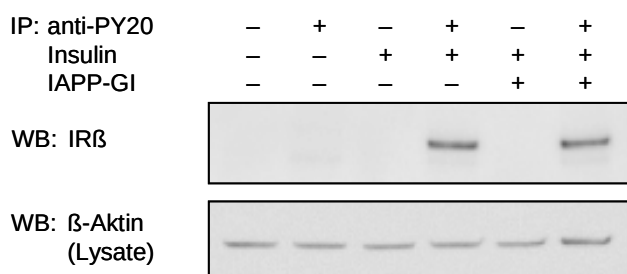


Abbildung 3.38: Untersuchung der Wirkung von IAPP-GI auf bereits gebildete Insulin-Oligomere mittels nicht-reduzierender NuPAGE-Elektrophorese und Western-Blot mit anti-Insulin Antikörper. Zur Herstellung der Insulin-Oligomere wurde 20 μ M Insulin in Wasser pH 2 bei 60 °C inkubiert. Nach 24 h wurde 200 μ M IAPP-GI dazugegeben. Bei $t = 0$ und nach einer Inkubation von 3 und 24 h wurden die Oligomere elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot (WB) durch einen anti-Insulin-Antikörper analysiert. (A) WB von oligomerem Insulin und einer Mischung aus Insulin-Oligomeren und IAPP-GI (1/10). Der Western-Blot ist repräsentativ für $n = 2$ Experimente. (B) MTT-Reduktionsassay von Insulin-Oligomeren und einer 1/10 Mischung mit IAPP-GI (Mittelwert $\pm$ SEM aus $n = 3$ Messungen).

3.4.7 Effekt von IAPP-GI auf die Bioaktivität von Insulin

Als letztes wurde die entscheidende Frage aufgegriffen, ob die IAPP-GI/Insulin-Interaktionen die Wirkung von Insulin auf seine Zielzellen beeinflussen kann. Die Bioaktivität von Insulin wird über die Bindung von monomerem Insulin an den Insulinrezeptor (IR) vermittelt [280, 281]. Darauf folgt die Übertragung des Signals in die Zell und weiter zu dem Zellkern über eine Kaskade von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Phosphorylierungen [280-282]. Beim ersten Phosphorylierungsschritt, direkt nach der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor, wird dessen β -Untereinheit (IR β) autophosphoryliert [281, 282]. Daher wurde hier an der Brustkrebszelllinie MDA-MB 468, die humanen Insulinrezeptor (IR) exprimiert [259, 260], untersucht, ob die von Insulin induzierte Autophosphorylierung des IRs von IAPP-GI beeinflusst wird. Die Zellen wurden mit Insulin (1 μ M) und einer Insulin/IAPP-GI-Mischung (1/10) stimuliert. Hierfür wurde Insulin (20 μ M), IAPP-GI (200 μ M) und die 1/10-Mischung in H₂O pH 2 gelöst und in Zellkulturmedium verdünnt. Die Lösungen wurden 5 min bei 37 °C vorinkubiert bevor sie zu den Zellen dazugegeben wurden. Nach dem Lysieren der Zellen wurden die phosphorylierten Proteine mithilfe eines anti-Phosphotyrosin Antikörpers (anti-PY 20) und Protein A Sepharose-Kügelchen immunopräzipitiert (IP) und nach NuPAGE-Elektrophorese und Western-Blot (WB) mit einem gegen die β -Untereinheit des IRs gerichteten Antikörpers detektiert. Wie aus dem WB (Abbildung 3.39 A) ersichtlich ist, haben Zellen, die mit Insulin oder der Insulin/IAPP-GI-Mischung stimuliert wurden, einen gleichen Gehalt an phosphorylierten Insulinrezeptor. Dem entgegen war – wie erwartet – in den Lysaten nicht-stimulierter Zellen kein phosphorylierter Insulinrezeptor vorhanden. Zur Kontrolle der Menge an zellulären Proteinen wurde in jedem Lysat der Gehalt an β -Aktin bestimmt (Abbildung 3.39 A und B unten). Es stellte sich in der Tat heraus, dass in allen Spuren die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Somit kann man die Ergebnisse der WBs auch quantitativ betrachten.

A



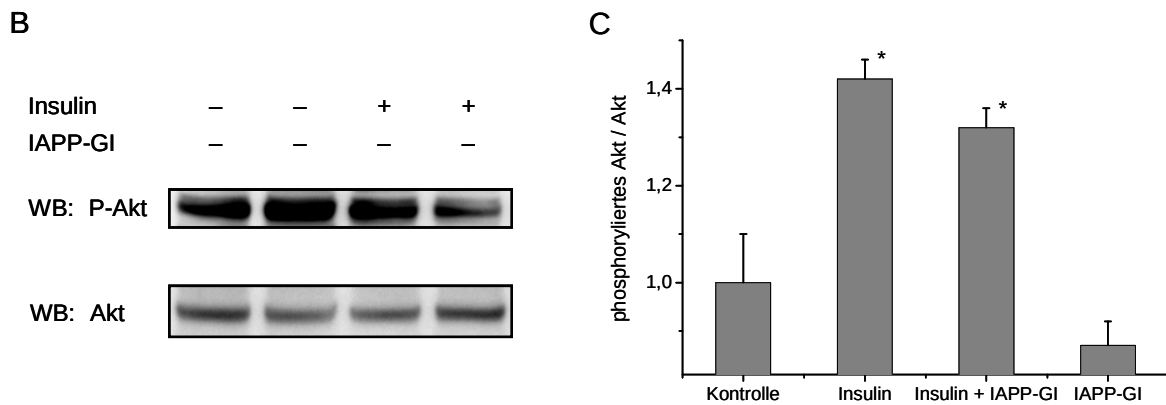


Abbildung 3.39: Untersuchung der Aktivierung des Insulinrezeptors (IR) von Insulin und einer Insulin/IAPP-GI-Mischung (1/10) mittels Immunopräzipitation, NuPAGE-Elektrophorese und Western-Blot (WB) mit anti-Insulinrezeptor β -Untereinheit (IR β) Antikörper. (A) WB der Lysate nicht-stimulierter und mit Insulin (1 μ M) bzw. einer 1/10 Insulin/IAPP-GI-Mischung behandelter Zellen. Nachweis des autophosphorylierten IRs. Die Kontrolle der Proteinmenge erfolgte durch die Detektion von β -Aktin in den Zelllysaten. (B) WB zur Bestimmung von Akt und phosphoryliertem Akt (pAkt) nach Stimulierung mit Insulin (1 μ M), einer 1/10 Insulin/IAPP-GI-Mischung und IAPP-GI allein. Detektion der Proteine durch spezifische AK gegen Akt und pAkt. (C) Graphische Darstellung der Verhältnisse von pAkt zu Akt nach densitometrischer Analyse der Banden des WBs von (B) (Mittelwert $\pm$ SEM aus $n = 3$ WBs). Die Western-Blot sind repräsentativ für $n = 3$ Experimente.

Die obigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass IAPP-GI mit einem 10-fach molaren Überschuss die Aktivierung des Insulinrezeptors *in vitro* nicht beeinträchtigt. Diese Daten wurden durch eine weitere Studie belegt. Ein Mediator der Signalkaskade von Insulin ist auch das Protein Akt. Nach der Autophosphorylierung des Insulinrezeptores wird Akt während der Signalübertragung durch einen weiteren Phosphorylierungsschritt aktiviert, und das Signal wird durch phospho Akt (pAkt) ins Zytoplasma geleitet. Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Akt und phosphoAkt wurde der Gehalt dieser Moleküle in den Zelllysaten nach Stimulation mit Insulin, mit der Insulin/IAPP-GI-Mischung (1/10) und mit IAPP-GI allein bestimmt (Abbildung 3.39 B). Die Banden wurden quantifiziert und das Verhältnis zwischen Akt und pAkt berechnet. Die graphische Darstellung in Abbildung 3.39 C zeigt, dass nach der Inkubation mit Insulin und der Mischung der Gehalt an phosphoAkt sich um 42 bzw. 32 % im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen (Kontrolle) erhöhte. Die Behandlung der Zellen mit IAPP-GI führte dagegen zu keiner zusätzlichen Phosphorylierung von Akt. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Wechselwirkung von IAPP-GI mit nicht-aggregiertem Insulin keinen Einfluss auf dessen biologische Aktivität (*in vitro*) hat.

Da Insulin wahrscheinlich in seiner monomeren Form an den Rezeptor bindet, sollte aggregiertes Insulin eine schwächere Bioaktivität aufweisen als monomeres Insulin. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IAPP-GI die Insulinaggregation blockieren kann. Daher sollte nun IAPP-GI auch in der Lage sein die Reduktion der Bioaktivität des Insulins im Prozess seiner Aggregation zu unterbinden. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Insulin (20 μ M), eine 1/1- und 1/10-Mischung mit IAPP-GI in Wasser pH 2 bei 60 °C inkubiert. Nach 7 Tagen

wurden die Lösungen in Zellkulturmedium verdünnt und für die Stimulation des IRs der MDA-MB 468 Zellen verwendet (Insulin-Endkonzentration auf Zellen: 100 nM). Zur Kontrolle wurden die Zellen auch mit einer frisch hergestellten Insulinlösung behandelt. Auch hier wurden aus den Zelllysaten zunächst die phosphorylierten Proteine mithilfe eines anti-Phosphotyrosin Antikörpers (anti-PY 20) und Protein A Sepharose-Kügelchen isoliert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und des Western-Blottings wurde der phosphorylierte Rezeptor mit einem anti-IR β -Untereinheit Antikörper (anti-IR β) nachgewiesen. Der Gehalt an zellulären Proteinen wurde in den Lysaten durch die Detektion des β -Aktins kontrolliert (Abbildung 3.40 unten). Anhand des anti-IR β -Western-Blots ist deutlich zu sehen, dass Zellen, die mit der gealterten Insulinlösung und der 1/1-Mischung stimuliert wurden, einen deutlich geringeren Anteil an phosphorylierten Insulinrezeptor aufweisen, als diejenigen, die mit frisch gelöstem Insulin behandelt wurden (Abbildung 3.40). Durch den 10-fachen Überschuss an IAPP-GI wurde die Bioaktivität von Insulin, trotz der Aggregations-induzierten Bedingungen, beibehalten. Diese Daten deuten darauf hin, dass durch die Wechselwirkung mit IAPP-GI und die IAPP-GI-induzierte Inhibierung der Insulinaggregation die bioaktive Konformation des Insulins nicht beeinträchtigt wurde.

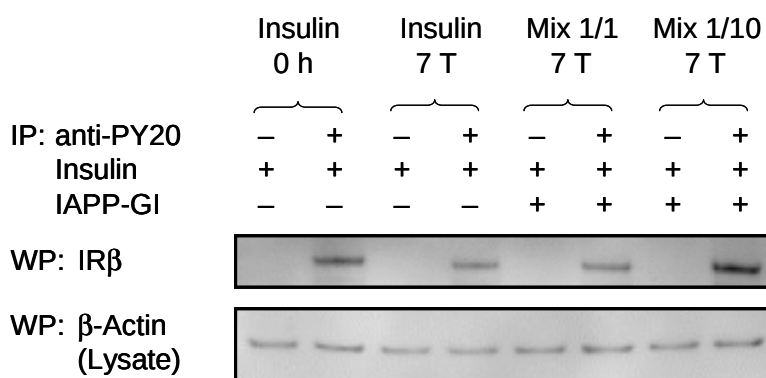


Abbildung 3.40: Untersuchung der Wirkung von IAPP-GI auf die Reduktion der Bioaktivität von Insulin im Verlauf seiner Aggregation, mittels Immunopräzipitation des phosphorylierten IRs und Western Blot mit Insulinrezeptor β -Untereinheit (IR β) Antikörper. MDA-MB 468 Zellen wurden mit frisch gelöstem Insulin (100 nM), mit gealtertem (pH 2, 60 °C, 7 Tage) Insulin (100 nM), mit einer gealterten Insulin/IAPP-GI- 1/1 und mit einer 1/10-Mischung (100 nM/1 μ M) stimuliert. Aus den Zelllysaten wurden zunächst die phosphorylierten Proteine mit einem anti-Phosphotyrosin AK (Anti-PY 20) isoliert. Die β -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR β) wurde mittels Western-Blot Analyse (WB) durch einen anti-IR β -Antikörper nachgewiesen. Die Kontrolle der Proteinmenge in den Zelllysaten erfolgte durch die Detektion von β -Aktin. Der Western-Blot ist repräsentativ für n = 2 Experimente

4 Diskussion

Ein möglicher Therapieansatz, um die Aggregation amyloider Peptide zu toxischen Spezies zu blockieren, und damit einen Ausbruch von Proteinaggregationskrankheiten zu unterbinden, besteht darin, Substanzen zu entwickeln, welche an das zur Missfaltung neigende Peptid binden und seine native oder nicht-toxische Konformation stabilisieren könnten. Diese Strategie wurde in unserer Arbeitsgruppe angewandt, um Inhibitoren der Aggregation des Inselamyloid-Polypeptids (IAPP) zu entwickeln. Anhand von N-Methylierungen zweier Amidbindungen in einer IAPP-Kernsequenz (IAPP 22-27), wurde versucht die Anzahl der intermolekularen Wasserstoffbrücken in diesem Sequenzabschnitt zu reduzieren. Durch diese Strategie konnte die konformationelle Flexibilität und die β -Faltblatt-/Fibrillenbildungsfähigkeit der IAPP-Moleküle stark beeinträchtigt werden. Somit wurde die zytotoxische Aggregation und Fibrillenbildung von IAPP unterbunden [95, 96]. Es wurden vier solche IAPP-Analoga entwickelt, die sich durch N-Methylierungen an unterschiedlichen Positionen in der Kernsequenz 22-27 unterscheiden: IAPP-GI, IAPP-FA, IAPP-LA, und IAPP-IL (siehe Abbildung 1.15). *In vitro* Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass vor allem IAPP-GI eine nicht-toxische und nicht-amyloidogene IAPP-Konformation nachahmt, und ist darüber hinaus in der Lage die IAPP-Aggregation zu toxischen Oligomeren und Fibrillen mit einer Aktivität im nanomolaren Bereich zu hemmen [97].

4.1 Untersuchung der Selbst- und Heteroassoziation von IAPP und der IAPP-Analoga mittels Fluoreszenzspektroskopie

Um die Fähigkeit der IAPP-Analoga zur Selbstassoziation zu untersuchen, und dadurch den Einfluss der N-Methylierungen auf die intermolekulare Erkennungseigenschaften der Analoga zu bestimmen, wurden Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Anhand dieser Methode wurden Fluoreszenzänderungen der mit Fluorescein markierten Peptide gemessen, welche durch Änderungen der Umgebung des Fluorophors verursacht werden. Diese Umgebungsänderung ist auf eine Interaktion mit dem Bindungspartner zurückzuführen. Aus den entsprechenden Titrationskurven kann man direkt die Affinität der Interaktion ableiten. Ein großer Vorteil dieser Messmethode ist, dass sie aufgrund ihrer hohen Sensitivität auch bei sehr kleinen Peptidkonzentrationen durchführbar ist. Vor allem für die Untersuchung von Peptiden mit hoher Aggregationsneigung, wie beispielsweise das IAPP, ist es wichtig in einen Konzentrationsbereich zu arbeiten, bei dem sich das Peptid hauptsächlich in einem nicht-aggregierten Zustand befindet. Um die Daten, die anhand dieser sensitiven Methoden gemessen wurden nicht zu verfälschen, war es

wichtig die verwendeten Peptide zuvor mittels HPLC zu reinigen, und die somit eventuell während der Lagerung entstandenen Aggregate vom monomeren Peptid zu trennen.

Bis heute wurden noch keine genauen Angaben über die IAPP/IAPP-Interaktion in der Literatur gemacht. Anhand einiger indirekter biophysikalischer Studien wurde angenommen, dass die IAPP-Selbstassoziation in einem nanomolaren Konzentrationsbereich stattfinden müsste [58, 79, 88]. Zunächst wurden konzentrationsabhängige Untersuchungen der Fluoreszenzemission von N-terminal Fluorescein-markiertem IAPP (Fluos-IAPP) allein durchgeführt. Da zwischen Fluos-IAPP 1 und 4 nM ein proportionaler Anstieg der Fluoreszenz gemessen wurde [94], ist anzunehmen, dass sich Fluos-IAPP bei dieser niedrigen Konzentration von 1 nM entweder in einem monomeren oder stabilen oligomeren Zustand befindet. Nach dieser Voruntersuchung wurde Fluos-IAPP 1 nM mit unmarkiertem IAPP titriert. Anhand der sigmoidalen Bindungskurve wurde eine apparente Dissoziationskonstante (K_D) der Fluos-IAPP/IAPP-Komplexe von 10 nM berechnet. Dieser Wert stimmt mit der oben erwähnten Annahme überein. Da IAPP in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 pM-500 nM zu Fluos-IAPP zugegeben wurde, bei dem das Peptid partiell in einem aggregierten Zustand vorliegen könnte, ist die Stöchiometrie dieser Interaktion nicht bekannt. Um die Berechnung der K_D jedoch zu vereinfachen, ist man hier von einer 1/1-Stöchiometrie ausgegangen. Daher sind die hier berechneten Dissoziationskonstanten als apparente K_D s angegeben. Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch partiell aggregiertes Fluos-IAPP (10 nM) mit IAPP mit einer apparenten Konstante von 16 nM assoziieren kann. Anhand dieser Messmethode konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob unterschiedlich große Komplexe gebildet werden und aus wie vielen IAPP-Molekülen diese bestehen.

Die ermittelten Konstanten der IAPP/IAPP-Interaktion dienen zum Vergleich mit der Selbstassoziation der IAPP-Analoga. Hierfür wurden Fluorescein-markierte Analoga (1 nM) mit den entsprechenden unmarkierten Bindungspartnern titriert. Aus den berechneten apparenten Dissoziationskonstanten ist zu entnehmen, dass alle Analoga, ähnlich wie IAPP, mit K_D s, welche in einem niedrigen nanomolaren Bereich liegen (4-60 nM), mit sich selbst assoziieren. Sogar IAPP aus Ratten (rIAPP), welches in der Kernsequenz (20-29) drei Prolinreste besitzt (Abbildung 1.13), die dessen Fibrillenbildungstendenz stark beeinträchtigen [77], kann mit einer app. K_D von 4 nM mit sich selbst assoziieren. Unterschiede zwischen den maximalen Fluoreszenzerhöhungen (50-170 %) wurden beobachtet und deuten auf verschiedene gebildete Konformationen und Heterokomplexe der Peptide hin, welche unterschiedlich die Fluoreszenzemission des N-terminalen Fluorescein-Restes beeinflussen könnten.

Diese Daten deuten darauf hin, dass an der Selbstassoziation des IAPP und seinen Analoga nicht nur die Kernsequenz 20-29, sondern auch andere Sequenzabschnitte beteiligt sein müssen. Dieser Rückschluss wird auch durch Studien anderer Arbeitsgruppen, welche zeigten, dass die IAPP-Fragmente 8-20 [261] und 30-37 [262] ebenfalls in der Lage sind

fibrilläre Strukturen auszubilden und an intermolekularen Bindungen beteiligt sind, unterstützt [263].

Als nächstes wurde untersucht mit welcher Affinität die IAPP-Analoga an Fluos-IAPP (1nM) binden. Anhand der berechneten Dissoziationskonstanten ließ sich feststellen, dass alle Analoga, auch rIAPP, mit Fluos-IAPP Heterokomplexe bilden können, die eine apparente K_D in einem niedrigen nanomolaren Bereich aufweisen (app. K_D 14-32 nM). Da die Heteroassoziation in einem Konzentrationsbereich untersucht wurde, bei dem die Selbstassoziation der Analoga auch stattfindet, werden die berechneten Dissoziationskonstanten als app. K_D angegeben. Auch hier deuten Unterschiede bei der maximalen Fluoreszenzerhöhung auf verschiedene Konformationen und Heterokomplexe der Peptide hin, womit sich die unterschiedlichen Effekte der Analoga auf die IAPP-Aggregation erklären ließen. Auch das Kontrollpeptid rIAPP, welches die toxische IAPP-Aggregation nur wenig beeinflussen konnte [97], war, ähnliche wie die Analoga, in der Lage IAPP mit hoher Affinität zu binden (app. K_D 17 nM).

Die Daten dieser Bindungsstudien weisen darauf hin, dass die vorher beobachteten Unterschiede zwischen den inhibitorischen Effekten der IAPP-Analoga und des rIAPP auf die zytotoxische Aggregation des IAPP – IAPP-GI $\gg$ IAPP-LA > IAPP-FA > IAPP-IL > rIAPP [96] – nicht auf Unterschiede zwischen den IAPP-Bindungsaffinitäten der Analoga zurückzuführen sind. Möglicherweise können IAPP-FA, IAPP-LA, und IAPP-IL aufgrund der unterschiedlichen Positionen der N-Methylierungen die IAPP-Konformation, welche zu toxischen Spezies weiter aggregiert, nicht binden bzw. ausreichend stabilisieren wie es bei IAPP-GI der Fall zu sein scheint.

Um festzustellen, ob die N-terminale Fluorescein-Markierung des IAPP einen Einfluss auf die Wechselwirkung mit den Analoga hatte, wurden die Analoga N-terminal mit Fluorescein markiert und mit IAPP titriert. Auch durch diese Messreihe wurde gezeigt, dass IAPP mit den Analoga Heterokomplexe in einem nanomolaren Konzentrationsbereich ausbilden kann (app. K_D 6-24 nM). Die apparenten Dissoziationskonstanten, die anhand der zwei Titrationsreihen Fluos-IAPP (1 nM) + Analogon (1-500 nM) und Fluos-Analogon (1 nM) + IAPP (1-500 nM) bestimmt wurden, unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Aus den Bindungsstudien bezüglich der Selbstassoziation ist bekannt, dass sich die Peptide bei 1 nM in einem stabilen Zustand befinden und ab einer bestimmten Konzentration (≥ 10 nM) weiter mit sich selbst assoziieren können. Anhand dieser Messreihen konnte, trotz der Selbstassoziation der Peptide, festgestellt werden, dass die Markierung mit Fluorescein keinen signifikanten Einfluss auf ihre IAPP-Bindungsfähigkeit hat.

Zusätzlich wurde am Beispiel von IAPP-GI gezeigt, dass IAPP mit diesem Analogon (bei 10 nM) Heterokomplexe in einem niedrigen nanomolaren Bereich bilden kann, auch wenn beide Peptide sich in einem Zustand, bei dem sie partiell aggregiert sind, befinden.

Anhand des Fluoreszenz-Bindungsassays wurde festgestellt, dass sowohl IAPP als auch seine Analoga in einem niedrig nanomolaren Bereich selbstassoziiieren. Außerdem können die Analoga, unabhängig von ihrer Neigung zur Selbstassoziation, an unterschiedliche IAPP-Konformationen und/oder frühen oligomeren Strukturen binden. Diese Messmethode ist jedoch nicht geeignet, um festzustellen an welche IAPP-Spezies die einzelnen Analoga binden. Es ist anzunehmen, dass IAPP-GI, als effektivster IAPP-Aggregationsinhibitor, im Gegensatz zu den anderen Analoga, die größte Affinität besitzt an jene IAPP-Spezies zu binden, welche weiter zu toxischen Aggregate assoziieren.

4.2 Wechselwirkung mit A β (1-40) und Effekte der IAPP-Analoga auf die A β (1-40)-Aggregation zu zelltoxischen Spezies und Fibrillen

Die Alzheimer-Krankheit und der Typ II-Diabetes gehören zu den am häufigsten vorkommenden zelldegenerativen Erkrankungen. Dabei hängen die Fehlfaltung und Selbstassoziation von Peptiden zu zytotoxischen Oligomeren und Amyloidfibrillen mit der Pathogenese der Krankheit eng zusammen. Darüber hinaus weisen Daten aus klinischen Studien darauf hin, dass die Alzheimer-Krankheit und der Typ II-Diabetes auch in einem Zusammenhang stehen könnten. Es wurde gezeigt, dass Typ II-Diabetiker einem größeren Risiko ausgesetzt sind an Alzheimer zu erkranken, und umgekehrt [264, 265].

Bei den amyloiden Peptiden der Alzheimer-Krankheit und des Typ II-Diabetes handelt es sich um das Amyloid- β -Peptid, ein aus 40 (A β (1-40)) bis 42 (A β (1-42)) Aminosäuren bestehendes Polypeptid [107], bzw. um das Inselamyloid-Polypeptid (IAPP), das aus 37 Aminosäureresten aufgebaut ist [66, 67]. Diese zwei kurzen Polypeptidketten zeichnen sich durch eine hohe konformative Flexibilität und eine hohe Aggregationsneigung aus [266]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass einige amyloide Peptide und Proteine, darunter auch A β und IAPP, zytotoxische Oligomere bilden können, die alle durch einen einzigen Antikörper erkannt wurden. Dadurch wurde angenommen, dass toxische Oligomere, die aus unterschiedlichen aggregierenden Peptiden/Proteinen gebildet werden, ähnliche Strukturmerkmale aufweisen [53].

Beim Vergleich der A β (1-40)- und der IAPP-Sequenz stellte sich heraus, dass sie zu 25 % identisch und zu 50 % ähnlich sind. Vor allem innerhalb der kurzen Sequenzabschnitte A β (15-21) und IAPP(10-16) bzw. A β (26-32) und IAPP(21-27), die an der Selbstassoziation von A β (1-40) und IAPP beteiligt sein sollen [86, 267, 268], wurde die höchste Identität und Ähnlichkeit entdeckt (Abbildung 4.1). Des Weiteren wurde berichtet, dass sehr geringe Mengen an fibrillären A β (1-40)-Aggregaten die Amyloidbildung des IAPP beschleunigen können [267].

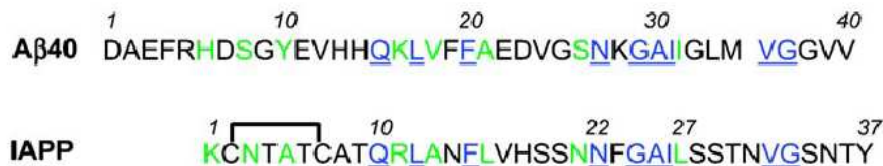


Abbildung 4.1: Vergleich der Primärstrukturen von Aβ(1-40) und IAPP. Identische Aminosäuren sind in blau dargestellt und unterstrichen. In grün sind ähnlich Aminosäuren markiert. Quelle [269].

Diese Befunde haben zu der Annahme geführt, dass bestimmte Aβ(1-40)- und IAPP-Konformationen oder Aggregate miteinander wechselwirken und vermutlich dadurch ihre Aggregationsprozesse beeinflussen könnten [269]. Aufgrund dieser Vermutung wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die IAPP-Analoga auch die zytotoxische Aβ(1-40)-Aggregation beeinflussen könnten. Hierfür wurden die Phäochromozytom-Zelllinie (PC-12) und der MTT-Reduktionsassay [230] verwendet, anhand dessen die Zellschädigung bzw. Zellvitalität gemessen werden konnte. 4 Tage gealtertes Aβ(1-40) (10 µM) und 1/1-Mischungen mit den IAPP-Analoga wurden mit den PC-12-Zellen inkubiert. Zellen, die mit aggregiertem Aβ(1-40) behandelt wurden, zeigten bei einer Aβ(1-40)-Konzentration von 750 nM (24-stündige Inkubation) eine um 30 % verminderte Zellvitalität. IAPP-GI konnte jedoch die Ausbildung toxischer Aβ(1-40)-Spezies vollständig blockieren. Der inhibitorische Effekt der anderen Analoga – IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL – war signifikant, aber deutlich geringer. Alle IAPP-Analoga hatten keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen.

Als Negativkontrolle wurde IAPP aus Ratten verwendet (rIAPP), das ein nicht-amyloides IAPP-Analogon ist [77]. Dieses Peptid hatte keine signifikante Wirkung auf die Zytotoxizität von Aβ(1-40). Dieser Befund weist darauf hin, dass der inhibitorische Effekt von IAPP-GI, IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL auf eine spezifische Wechselwirkung mit Aβ(1-40) zurückzuführen ist.

Der Effekt von nicht-aggregiertem IAPP, auf die Bildung zytotoxischer Aβ(1-40)-Aggregate, wurde hier ebenfalls in einem Pilotexperiment untersucht. Unter diesen Versuchsbedingungen war die IAPP-Toxizität in einem Konzentrationsbereich von 10-100 nM um 15 % höher als die Zytotoxizität des Aβ(1-40). Die IAPP/Aβ(1-40)-Mischung (1/1) hatte dennoch eine geringere toxische Wirkung als die einzelnen Peptide. Diese Ergebnisse, sowie mehrere detaillierte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [269], weisen daraufhin, dass beide amyloide Peptide miteinander wechselwirken können, nicht-toxische und nicht-fibrilläre Heterokomplexe bilden können, und somit ihre Aggregation zu toxischen Spezies teilweise gegenseitig blockieren können.

Die Wirkung des IAPP-GI wurde mit dem Effekt eines weiteren IAPP-Inhibitors verglichen, des Hexapeptids NF(N-Me)GA(N-Me)IL (NFGAIL-GI). Dieses Peptid wurde aus der IAPP-Amyloidkernsequenz 22-27 (NFGAIL) abgeleitet, und wie IAPP-GI an den Amidbindungen von Glycin und Isoleucin N-methyliert. Vorstudien der Arbeitsgruppe zeigten, dass dieses modifizierte IAPP-Fragment, im Vergleich zu IAPP-GI, eine deutlich schwächere inhibitorische Wirkung auf die Ausbildung von toxischen IAPP-Aggregaten hat [94, 97].

Anhand des MTT-Assays ist zu sehen, dass auch hier NFGAIL-GI eine schwächere Wirkung als IAPP-GI auf die Bildung toxischer A β (1-40)-Aggregate hat. Anhand dieser Daten ist zu vermuten, dass die verkürzte IAPP-GI Sequenz nicht ausreichend ist, um die A β (1-40)-Aggregation vollständig zu blockieren.

Der Einfluss des IAPP-GI wurde auch auf die Ausbildung von toxischen Spezies, die bei einer 100 μ M A β (1-40)-Inkubationslösung entstehen, ausgetestet. Die 100 μ M A β (1-40)-Lösung war um 10 % toxischer als die 10 μ M. IAPP-GI erwies sich auch unter diesen Bedingungen als ein potentieller Inhibitor der zytotoxischen Aggregation von A β (1-40). Um den IC₅₀-Wert des IAPP-GI zu bestimmen, wurde A β (1-40) mit unterschiedlichen Konzentrationen an IAPP-GI inkubiert und auch die PC-12 Zellen gegeben. Anhand der Titrationskurve wurde ein IC₅₀-Wert von 78 nM berechnet (A β (1-40)-Endkonzentration auf Zellen: 100 nM). Somit wurde gezeigt, dass IAPP-GI die A β (1-40)-Zytotoxizität mit einer Aktivität im unteren nanomolaren Bereich inhibieren kann. Die inhibitorische Wirkung des IAPP-GI auf die Bildung zelltoxischer A β (1-40)-Aggregate wurde zusätzlich durch die Hemmung des A β (1-40)-induzierten apoptotischen Zelltods bestätigt. Die A β (1-40)-induzierte Apoptose wurde durch eine 1/1-Mischung mit IAPP-GI fast vollständig blockiert [269].

Um erste Hinweise über einen möglichen inhibitorischen Effekt von IAPP-GI auf die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen zu bekommen, wurden die Inkubationslösungen A β (1-40) und 1/1-Mischungen mit IAPP-GI, die für die Ermittlung der Zellvitalität verwendet wurden, elektronenmikroskopisch untersucht. Die EM-Aufnahmen zeigen, dass nach der 4-tägigen Inkubation, A β (1-40) bereits zu Fibrillen aggregiert ist. In Gegenwart von IAPP-GI wurde jedoch die Amyloidbildung stark unterdrückt. Diese Ergebnisse waren in sehr guter Übereinstimmung mit den Daten aus den anschließenden detaillierten Untersuchungen der Effekte der IAPP-Analoga auf die A β (1-40)-Aggregation [96, 269], und haben darauf hingewiesen, dass IAPP-GI nicht nur die Bildung von zytotoxischen Spezies, sondern auch die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen inhibieren kann.

Die Wechselwirkung zwischen A β (1-40), IAPP und den einzelnen IAPP-Analoga wurde mithilfe eines Fluoreszenz-Bindungsassays untersucht. Hierfür wurden N-terminal mit Fluorescein markierte Analoga mit A β (1-40) titriert. Aus den aufgenommenen Emissionsspektren ist zu entnehmen, dass die Fluoreszenz des Fluorophors sich in Abhängigkeit von der A β (1-40)-Konzentration erhöhte. Die apparenten Dissoziationskonstanten (app. K_D) wurden aus den sigmoidalen Bindungskurven berechnet. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass IAPP-GI ähnlich wie IAPP im unteren nanomolaren Bereich mit A β (1-40)-Heterokomplexe ausbilden kann (app. K_D 40 bzw. 50 nM). Auch die anderen Analoga, IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL, können mit A β (1-40) wechselwirken, jedoch ist die Affinität ihrer Bindung an A β (1-40) deutlich geringer. Die berechneten K_Ds sind um das 5 bis 11-fache höher, als die der A β (1-40)/IAPP-GI-Interaktion. Dies könnte die Ursache für den beobachteten geringeren inhibitorischen Effekt der IAPP-Analoga sein, der

während der Zellvitalitätsmessungen ermittelt wurde. Obwohl rIAPP keinen Einfluss auf die zytotoxische A β (1-40)-Aggregation hatte, kann A β (1-40) mit rIAPP im nanomolaren Bereich wechselwirken, was zu der Annahme führt, dass rIAPP an ein A β (1-40)-Konformer bindet, welches nicht an der toxischen A β (1-40)-Aggregation beteiligt ist.

Um den Aggregationszustand von A β (1-40) in den Konzentrationsbereich der Bindungsexperimenten mit den IAPP-Analoga zu bestimmen, wurde N-terminal mit 7-Diethylaminocoumarin-3-Carbonyl (DAC) markiertes A β (1-40) mit unmarkiertem A β (1-40) titriert. Es stellte sich heraus, dass aufgrund der A β (1-40)-Selbstassoziation sich die Fluoreszenzemission des DAC bei zunehmender A β (1-40)-Konzentration erhöhte. Anhand der Bindungskurve wurde eine app. K_D von 200 nM berechnet. Diese Messung wurde bei einer 10 nM DAC-A β (1-40)-Konzentration durchgeführt. Vorversuche mit 1 nM DAC-A β (1-40) + A β (1-40) (bis zu 1 μ M) zeigten, dass in diesem Konzentrationsbereich die gebildeten Komplexe sehr instabil sind (25 °C) und nach kurzer Zeit in der Lösung präzipitierten. Durch eine 10-fache Erhöhung der DAC-A β (1-40)-Konzentration (25 °C) konnte die Titration mit A β (1-40) nun durchgeführt werden.

Um den Einfluss der N-terminalen Fluorescein-Markierung der Analoga auf ihre Wechselwirkung mit A β (1-40) zu untersuchen, wurde DAC-A β (1-40) (10 nM) mit IAPP-GI und IAPP titriert. Statt einer Fluoreszenzzunahme, wie bei der Assoziation zwischen DAC-A β (1-40) mit A β (1-40) wurde hier eine Abnahme der Fluoreszenz gemessen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Fluoreszenzemission des Fluorophors DAC in einer hydrophoben Umgebung steigt und bei einer hydrophilen Umgebung dagegen absinkt [239]. Dies bedeutet, dass bei der DAC-A β (1-40)/A β (1-40)-Interaktion sich hydrophobe Peptidabschnitte in der Nähe des Fluorophors befinden. Im Gegensatz dazu, scheint DAC bei der Ausbildung der Heterokomplexe mit IAPP-GI bzw. IAPP von hydrophilen Peptidabschnitten oder mehr von Wassermolekülen umgeben zu sein. Für die DAC-A β (1-40)/IAPP-GI-Heteroassoziation wurde eine app. K_D von 270 nM und für die DAC-A β (1-40)/IAPP-Interaktion eine app. K_D von 120 nM berechnet. Anhand der Titrations von Fluos-IAPP-GI bzw. Fluos-IAPP (1 nM) mit A β (1-40) wurden niedrigere Dissoziationskonstanten ermittelt (app. K_D 40 bzw. 50 nM). Dies könnte auf den Assoziationszustand des IAPP-GI und IAPP zurückzuführen sein. Während sich diese Peptide, bei einer Konzentration von 1 nM, hauptsächlich in einem monomeren Zustand befinden, liegen sie bei höheren Konzentrationen, wie bei den DAC-A β (1-40)/IAPP-GI- bzw. DAC-A β (1-40)/IAPP-Studien, eher als Oligo- und Multimere vor. Da man auch hier nicht von einer 1/1-Stöchiometrie bei der Wechselwirkung zwischen DAC-A β (1-40) und IAPP-GI- bzw. IAPP ausgehen konnte, sind die berechneten Dissoziationskonstanten als apparente K_D s angegeben.

Anhand der Bindungsstudie wurde festgestellt, dass sowohl IAPP-GI als auch IAPP mit A β (1-40) im unteren nanomolaren Bereich wechselwirken können. IAPP-GI kann jedoch, im

Gegensatz zu IAPP, die A β (1-40)-Aggregation zu toxischen Spezies vollständig blockieren. Gründe für die unterschiedliche Wirkung könnten die spezifische nicht-amyloidogene Konformation, in die IAPP-GI eingeschränkt wurde, sein, die konformationelle Flexibilität der IAPP-Moleküle, und die Tatsache, dass die IAPP-Moleküle selbst sehr stark im niedrigen nanomolaren Bereich zur Aggregation neigen, was zu einer Konkurrenz zwischen der Homo- und Heteroassoziation im Falle der IAPP/A β (1-40)-Mischung führen würde.

Um mögliche Unterschiede bezüglich der Wechselwirkungsarten von IAPP-GI und IAPP mit A β (1-40) zu untersuchen, wurden FRET-Messungen durchgeführt. Für diese Versuche wurde das Fluorophor DAC als Donor am N-Terminus von A β (1-40) (DAC-A β (1-40)) und Fluorescein als Akzeptor am N-Terminus von IAPP-GI bzw. IAPP (Fluos-IAPP-GI, Fluos-IAPP) eingebaut. Je geringer der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist, desto höher ist der Energietransfer, d. h. die gemessene Fluoreszenzemission der angeregten Donormoleküle nimmt ab und die Fluoreszenz des Akzeptors nimmt zu. Sollten somit die N-terminalen Regionen des DAC-A β (1-40) und Fluos-IAPP-GI bzw. Fluos-IAPP miteinander wechselwirken, würde ein hoher Energietransfer zu erwarten sein. Falls der N-Terminus des einen Peptids an den C-Terminus des Interaktionspartners binden sollte, wäre dann mit einem niedrigeren Energietransfer zu rechnen.

Um ein detektierbares FRET-Signal zu erhalten, wurden die Messungen bei 50 nM an DAC-A β (1-40), Fluos-IAPP-GI und Fluos-IAPP durchgeführt. Bei dieser Konzentration liegen jedoch die Interaktionspartner bereits in einem selbstassoziierten Zustand vor. Die Daten dieser Messreihe deuten darauf hin, dass sowohl bei der DAC-A β (1-40)/Fluos-IAPP-GI-Interaktion als auch bei der Wechselwirkung von DAC-A β (1-40) mit Fluos-IAPP ein Energietransfer stattgefunden hat. Die Ergebnisse aus den drei unabhängigen Messungen sind jedoch sehr unterschiedlich. Zur Kontrolle der gemessenen FRET-Daten – Abnahme der DAC- und Zunahme der Fluorescein-Emission – wurde 50 nM DAC-A β (1-40) mit 50 nM IAPP-GI bzw. IAPP und 50 nM Fluos-IAPP-GI (-IAPP) mit 50 nM A β (1-40) gemischt und die Änderung der Fluoreszenz gemessen. Auch hier unterscheiden sich die Daten aus drei Messungen sehr voneinander. Es ist anzunehmen, dass Unterschiede der Wiederholungsmessungen auf die Selbstassoziation der Interaktionspartner, welche die Fluoreszenzemission der markierten Peptide auch beeinträchtigen kann, zurückzuführen sind. Aus diesem Grund waren die gemessenen FRET-Daten nicht schlüssig.

Die Fähigkeit des effektivsten Inhibitors IAPP-GI an prä-fibrilläre A β (1-40)-Spezies zu binden, wurde durch den Biotin-pull-down-Assay bestätigt. Die Biotin-IAPP-GI/A β (1-40)-Heterokomplexe wurden durch die Bindung an Streptavidin-beschichtete Kügelchen aus der Lösung isoliert und mittels NuPAGE-Elektrophorese und Western-Blots mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Anhand dieser Methode wurden signifikante Mengen an A β (1-40)-Monomere und -Dimere in der Mischung nachgewiesen.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass IAPP-GI auch an aggregierten A β (1-40)-Spezies binden kann. Aus anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass A β (1-40) nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen, unter den in dieser Arbeit verwendeten Inkubationsbedingungen, größtenteils zu Fibrillen aggregiert war [269]. Dies konnte anhand des Thioflavin-T Assays nachgewiesen werden. Thioflavin T ist ein Fluoreszenzfarbstoff der spezifisch an Fibrillen bindet. Fibrilläres A β (1-40) wurde mit Biotin-IAPP-GI inkubiert. Die Heterokomplexe wurden, wie bereits oben erwähnt, aus der Lösung isoliert. Im anti-A β (1-40) Western Blot konnte aber nur mono- und dimeres A β (1-40) nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass durch die Behandlungsbedingungen der Proben, die für eine elektrophoretische Auftrennung notwendig sind (Erhitzen auf 95 °C und Zugabe von SDS und DTT), die Struktur der A β (1-40)-Fibrillen zerstört und somit nur A β (1-40)-Dimere und Monomere detektiert werden. Anhand der Quantifizierung der A β (1-40)-Banden des Western-Blots wurde festgestellt, dass nach 24 h und 6 Tagen mehr A β (1-40)-Moleküle an der Ausbildung der Biotin-IAPP-GI/A β (1-40)-Heterokomplexe beteiligt sind. Dies hat darauf hingewiesen, dass Biotin-IAPP-GI an A β (1-40)-Spezies – A β (1-40)-Fibrillen und nicht-fibrillierten Monomeren – binden kann, welche vorwiegend in den gealterten A β (1-40)-Lösungen (24 h und 6 Tagen) vorhanden waren.

Anhand der Fluoreszenz-Bindungsstudie wurde festgestellt, dass die A β (1-40)-, IAPP- und IAPP-GI-Selbstassoziation, sowie auch die Ausbildung der A β (1-40)/IAPP- und A β (1-40)/IAPP-GI-Heterokomplexe im nanomolaren Bereich stattfindet. Es ist anzunehmen, dass die Neigung zur Selbstassoziation einen Einfluss auf die Stabilität der gebildeten Heterokomplexe, und somit auch auf die Inhibierung der zytotoxischen A β (1-40)-Aggregation durch IAPP-GI oder IAPP haben könnte. Diese Annahme wurde durch die kinetische Studie zur Stabilität der A β (1-40)/IAPP-GI- und A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe mittels Fluoreszenzspektroskopie verstärkt. Für diese Untersuchungen wurde Fluos-IAPP mit A β (1-40) und DAC-A β (1-40) mit IAPP bei einem 100-fachen Überschuss an unmarkiertem Peptid gemischt. Bei diesem Überschuss sind alle DAC-A β (1-40)- bzw. Fluos-IAPP-Moleküle mit dem Bindungspartner assoziiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der gebildeten Heterokomplexe innerhalb von 20 h gemessen. Bei diesem Mischungsverhältnis sind die meisten unmarkierten A β (1-40)- bzw. IAPP-Moleküle frei und können somit mit sich selbst assoziieren. Die Ergebnisse dieser Messreihe haben gezeigt, dass die aus DAC-A β (1-40) und IAPP oder Fluos-IAPP und A β (1-40) gebildeten Heterokomplexe kinetisch instabil sind, und dass ihre Instabilität mit der Erhöhung der Konzentration von A β (1-40) bzw. IAPP stärker wird. Die Fluoreszenzänderungen deuteten darauf hin, dass die zuerst gebildeten Heterokomplexe mit neu gebildeten A β (1-40)/A β (1-40)- bzw. IAPP/IAPP-Aggregate, die während der ersten 4 Stunden entstehen, wechselwirken und zusammen zu größeren Heterokomplexen assoziieren können. Zusätzlich wurde am Beispiel von IAPP gezeigt, dass dessen Selbstassoziation von der Temperatur abhängig ist. Durch die Erniedrigung der Temperatur auf 4 °C wird die IAPP-Selbstassoziation teilweise unterbunden, was zu einer

Stabilisierung der DAC-A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe (bei 4 °C) führt. Dem entgegen zeigte die Untersuchung von Fluos-IAPP-GI mit A β (1-40)- bzw. DAC-A β (1-40) mit IAPP-GI, dass die gebildeten Heterokomplexe auch bei einer Erhöhung der A β (1-40)-Konzentration stabil bleiben. Diese Daten stimmen mit den Zellvitalitätsuntersuchungen und EM-Aufnahmen überein, dass IAPP, aufgrund seiner hohen Tendenz zur Aggregation, die Ausbildung zytotoxischer A β (1-40)-Spezies nur teilweise unterbinden kann. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass beide amyloide Peptide, IAPP und A β (1-40) zusammen weiter aggregieren und höhere Heteroaggregate und Fibrillen ausbilden können. In der Tat haben Immunogold/TEM-Studien, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, auf die Bildung solcher Heteroaggregate hingewiesen. In gealterten A β (1-40)/IAPP-Lösungen wurden Hetero-Oligomeren und gemischten Fibrillen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu kann IAPP-GI die zytotoxischen A β (1-40)-Aggregation und Fibrillenbildung vollständig blockieren. Nach der Immunogoldmarkierung gealterter A β (1-40)/IAPP-GI-Lösungen wurden nur Hetero-Oligomere, jedoch keine Hetero-Fibrillen detektiert.

Die Instabilität von DAC-A β (1-40) wurde in dieser Versuchsreihe ebenfalls untersucht. Um den Assoziationsstatus von DAC-A β (1-40) zu charakterisieren, wurde seine Fluoreszenzemission bei verschiedenen Konzentrationen unter denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidinium) gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass die zeitabhängige Fluoreszenzänderung des DAC-A β (1-40) in einem Bereich von 1-360 nM mit zunehmender Konzentration abnahm. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass je höher die DAC-A β (1-40)-Konzentration ist, desto stabiler sind die gebildeten Komplexe. Zusammen mit der Messung in 6 M Guanidinium deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme von 10 nM DAC-A β (1-40) um eine Dissoziation handeln könnte.

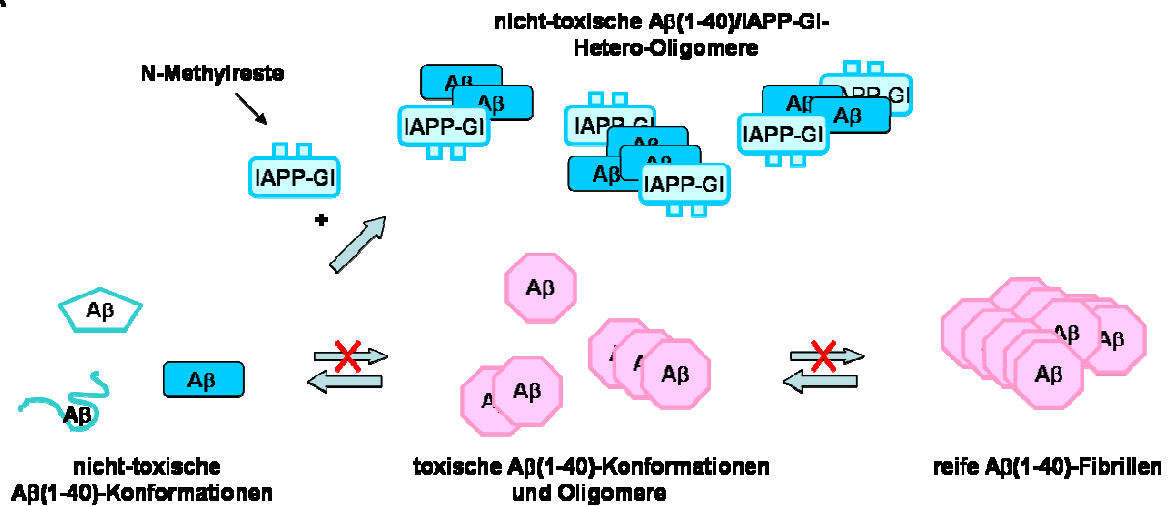
Die A β (1-40)/IAPP-GI-Heterokomplexe wurden durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd stabilisiert, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse charakterisiert. Anhand dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass A β (1-40) mit IAPP-GI hauptsächlich di-, tri- und tetramere Heterokomplexe ausbilden kann. Auch IAPP-GI allein kann zu niedermolekularen Strukturen (Di- bis Pentamere) oligomerisieren. Die Neigung des IAPP-GI mit sich selbst zu assoziieren, wurde bereits mit dem Fluoreszenz-Bindungsassay gezeigt. A β (1-40) allein bestand hauptsächlich aus Monomeren und Dimeren.

In Rahmen dieser Doktorarbeit und anderen detaillierten Untersuchungen der Arbeitsgruppe [269], wurde gezeigt, dass im Vergleich mit den anderen IAPP-Analoga IAPP-GI am effektivsten die zytotoxische A β (1-40)-Aggregation blockieren kann. IAPP-GI ist bereits im unteren nanomolaren Bereich aktiv und zählt dadurch zu den stärksten A β (1-40)-Liganden und potentiellen A β (1-40)-Aggregationsinhibitoren [270, 271]. Studien der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass IAPP-GI die IAPP-Aggregation zur Bildung von toxischen Spezies und Fibrillen bereits im niederen nanomolaren Bereich inhibieren kann [97]. Dieses

IAPP-Analogon stellt somit eine Leitstruktur für das Entwickeln neuer Therapeutika für die beiden bisher noch unheilbaren Krankheiten Alzheimer und Typ II-Diabetes dar.

Auf Basis der in dieser Doktorarbeit und aus den zusätzlichen Untersuchungen der Arbeitsgruppe [96, 269] beschriebenen Befunde, wurde ein Modell erstellt, welches die Wechselwirkungen von IAPP-GI und IAPP mit A β (1-40) dargestellt (Abbildung 4.2). Die Vorstufen zytotoxischer A β (1-40)-Aggregate sind prä-fibrilläre, nicht-zytotoxische Konformere. Durch die hochaffine Bindung von IAPP-GI an solchen frühen A β (1-40)-Spezies, könnten lösliche und nicht-toxische Hetero-Oligomere gebildet werden. A β (1-40) könnte dadurch nicht weiter mit sich selbst zu zytotoxischen Oligomeren und Fibrillen assoziieren. Ähnlicherweise könnten frühe prä-fibrilläre, nicht-zytotoxische IAPP- und A β (1-40)-Konformere untereinander wechselwirken und zunächst nicht-toxische Heterokomplexe ausbilden. Aufgrund jedoch der starken Neigung beider Polypeptide zur Bildung von β -Faltblattstrukturen und zur Selbstassoziation, könnten diese Heterokomplexe weiter zu gemischten Fibrillen bzw. toxischen Aggregaten assoziieren oder wieder dissoziieren, so dass jedes der Peptide mit sich selbst zu fibrillären Strukturen aggregieren kann. Dagegen sollten A β (1-40)/IAPP-GI-Heterokomplexe wegen der N-Methylierung einer der Amyloidkernregionen an IAPP nicht mehr eine β -Faltblattstruktur ausbilden können, die zu einer zytotoxischen Selbstassoziation und Fibrillogenese von A β (1-40) führen würde.

A



B

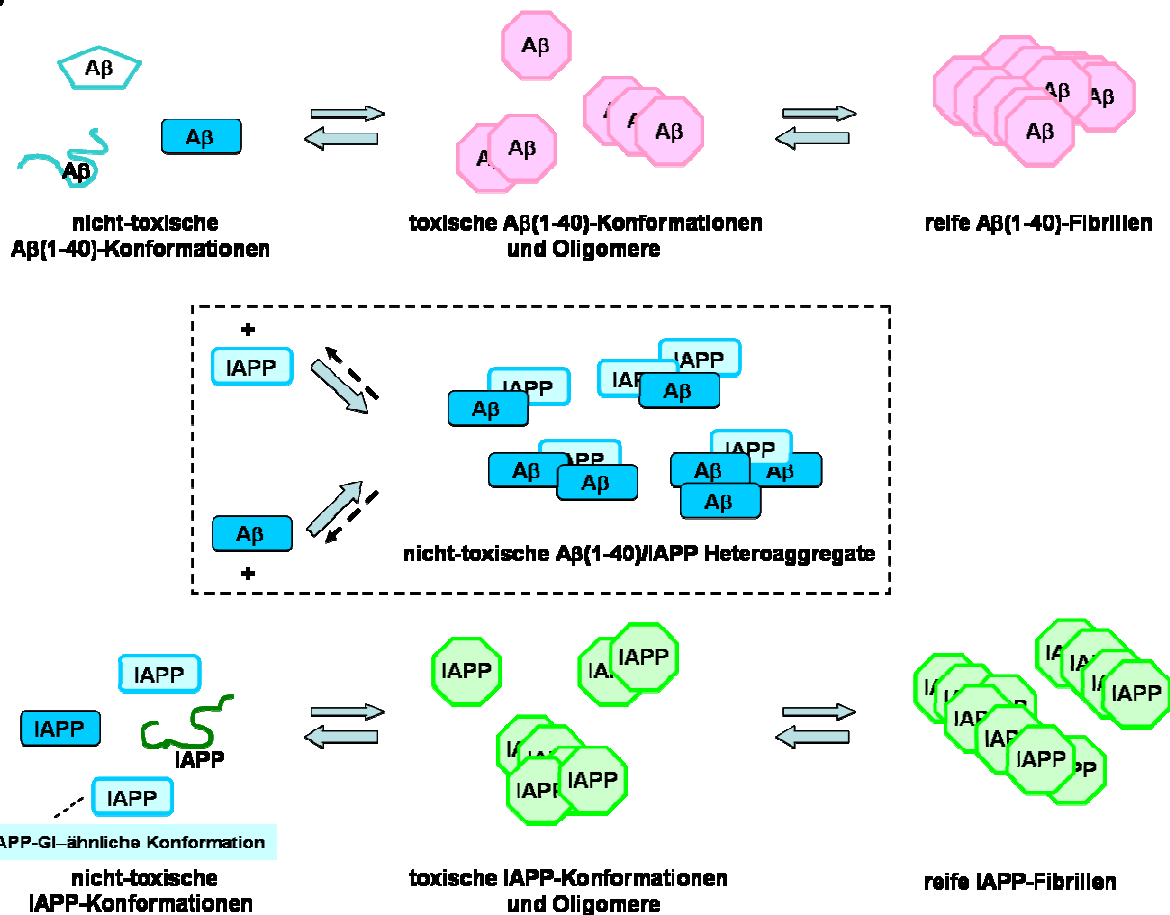


Abbildung 4.2: Vorgeschlagenes Modell für die Wechselwirkung von IAPP-GI bzw. IAPP mit Aβ(1-40). (A) IAPP-GI kann an frühe pre-fibrilläre, nicht-zytotoxische Aβ(1-40)-Konformationen binden. Durch die Ausbildung stabiler nicht-toxischer Heterokomplexe, wird die zytotoxische Oligomerisierung und Fibrillenbildung von Aβ(1-40) blockiert. (B) IAPP und Aβ(1-40) können mit sich selbst zu toxische Aggregate und Fibrillen assoziieren. Diese zwei amyloiden Peptide können auch untereinander wechselwirken und bilden Heterokomplexe aus, die jedoch instabiler sind, und mit der starken Neigung zur Selbstassoziation des IAPP und des Aβ(1-40) konkurrieren. Quelle [269].

4.3 Wechselwirkung von IAPP-GI mit A β (1-42) und Effekte auf die zytotoxischen A β (1-42)-Aggregation

Als Hauptbestandteil der Alzheimer-Plaques wurde nicht nur das A β (1-40), sondern auch das aus 42 Aminosäuren bestehendes Spaltprodukt (A β (1-42)) des Amyloid-Vorläuferproteins, identifiziert [107]. Durch die zwei weiteren Aminosäuren am C-Terminus, Isoleucin und Alanin, besitzt (A β (1-42)) eine höhere Hydrophobizität, hat im Vergleich zu A β (1-40) eine stärkere Neigung zur Selbstassoziation und weist eine höhere Zytotoxizität auf [131, 132].

In Vorversuchen zur Bestimmung der A β (1-42)-Toxizität an PC-12-Zellen, wurde festgestellt, dass die Aggregation von A β (1-42) zu zytotoxischen Spezies durch die entsprechenden Inkubationsbedingungen von A β (1-40) nicht induziert werden konnte. Erst durch eine Vorbehandlung mit einer Acetonitril/TFA/Wasser-Mischung [272], konnte A β (1-42) toxische Spezies ausbilden. Die Entstehung der zytotoxischen A β (1-42)-Aggregate konnte jedoch bei einer Zugabe von IAPP-GI (1/1) nicht unterbunden werden. Auch ein 10-facher Überschuss an IAPP-GI hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung von toxischen A β (1-42)-Spezies. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Prozess der A β -Aggregation abhängig von den experimentellen Bedingungen ist [146]. Je nach Vorbehandlung des A β können unterschiedliche Konformationen und Aggregations-Wege induziert werden. Daher ist anzunehmen, dass unter den hier gewählten Versuchsbedingungen A β (1-42) nicht die Konformation einnehmen kann, die mit IAPP-GI wechselwirken könnte. Um herauszufinden, ob A β (1-42) mit IAPP-GI wechselwirken kann, wurde N-terminal mit Fluorescein-markiertes IAPP-GI mit A β (1-42) titriert und die Fluoreszenzemissionen gemessen. Anhand der Bindungskurve wurde festgestellt, dass IAPP-GI mit A β (1-42), ähnlich wie mit A β (1-40), Heterokomplexe im unteren nanomolaren Bereich ausbilden kann.

Um zu verstehen, weshalb IAPP-GI trotz seiner Wechselwirkung mit A β (1-42) nicht in der Lage war die toxische A β (1-42)-Aggregation zu unterbinden, wurde ein Biotin-pull-down-Assay durchgeführt. Nach der Inkubation von Biotin-IAPP-GI mit A β (1-42) (1/2) wurden die gebildete Heterokomplexe durch die Bindung an Streptavidin-beschichtete Kügelchen aus der Lösung isoliert, und nach einer NuPAGE-Elektrophorese und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert. Zusätzlich wurden die Peptide durch eine Silberfärbung der Gele nachgewiesen. Anhand des anti-A β -WB – unter der Verwendung eines anti-A β (1-40)-Antikörpers – ist zu sehen, dass Biotin-IAPP-GI mit sehr geringen Mengen an A β (1-42) gebunden hatte. Dagegen konnte mit der Silberfärbung das an Biotin-IAPP-GI gebundene A β (1-42) deutlich nachgewiesen werden.

Anhand des Fluoreszenz-Bindungs- und Biotin-pull-down-Assays konnte gezeigt werden, dass IAPP-GI mit A β (1-42) wechselwirken kann. Mit diesen Methoden konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ob IAPP-GI auch an jene A β (1-42)-Konformation binden kann, die zur Ausbildung der zytotoxischen A β (1-42)-Spezies führt. Es ist auch unklar, ob durch die

Vorbehandlung mit der Acetonitril/TFA-Mischung A β (1-42) bereits in einer Form vorliegt, welche sehr schnell zur Ausbildung von zytotoxischen A β (1-42)-Spezies weiter aggregiert. Die bisherigen Ergebnisse bezüglich der IAPP-GI/A β (1-42)-Interaktion weisen darauf hin, dass IAPP-GI die A β (1-42)-Toxizität eventuell unterbinden könnte, wenn es an nicht-toxische A β (1-42)-Spezies binden würde.

Um mögliche Unterschiede zwischen den Heterokomplexen, die durch A β (1-40)/IAPP-GI und A β (1-42)/IAPP-GI gebildet werden, zu untersuchen, wurde A β (1-42) mit IAPP-GI mittels Glutaraldehyd quervernetzt, die Komplexe elektrophoretisch aufgetrennt und mithilfe des Western Blots detektiert. Die Daten zeigen, dass die Peptide, ähnlich wie A β (1-40) mit IAPP-GI, vor allem zu di-, tri- und tetrameren Heterokomplexen assoziieren. Ob A β (1-42) unter diesen Versuchsbedingungen bereits missgefaltete Konformationen einnehmen kann, die durch IAPP-GI nicht gebunden werden, oder ob IAPP-GI generell die toxische A β (1-42)-Aggregation nicht blockieren kann – da bekannt ist, dass A β (1-40) und A β (1-42) über unterschiedliche Wege aggregieren [132] – muss durch weiterführende Untersuchungen gezeigt werden.

4.4 Wechselwirkung von IAPP und den IAPP-Analoga mit Insulin und ihre Auswirkung auf die toxische Insulinaggregation, Fibrillogenese und Bioaktivität

Insulin, welches bei der Behandlung von Diabetes eingesetzt wird, zählt zu den am meisten verwendeten Biopharmazeutika [221, 274]. Es gehört zu den Polypeptiden, die unter bestimmten Bedingungen dazu neigen, zu nicht-natürlichen Oligomeren und unlöslichen Fibrillen zu aggregieren, wodurch deren biotechnologische Produktion, Lagerung und vor allem die therapeutische Anwendung erschwert wird. Beim Einsatz von inhibitorischen Molekülen, welche die Insulinaggregation unterbinden können, muss beachtet werden, dass die biologische Aktivität des Insulins dadurch nicht beeinflusst wird. Das Inselamyloid-Polypeptid (IAPP), welches zusammen mit Insulin in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse synthetisiert, gespeichert und sezerniert wird [58, 76, 277] und dessen Sequenz eine beachtliche Ähnlichkeit zu der von Insulin hat (Abbildung 4.3), ist ein natürlich vorkommendes Polypeptid das an Insulin binden kann. IAPP neigt jedoch stark zur Ausbildung von toxischen Aggregaten und Fibrillen [58]. Anhand von *in vitro*-Studien wurde gezeigt, dass durch die Wechselwirkung zwischen IAPP und Insulin die IAPP-Fibrillenbildung deutlich verzögert wird [61]. Somit könnte IAPP ein natürlich vorkommender Inhibitor der Insulinaggregation sein.

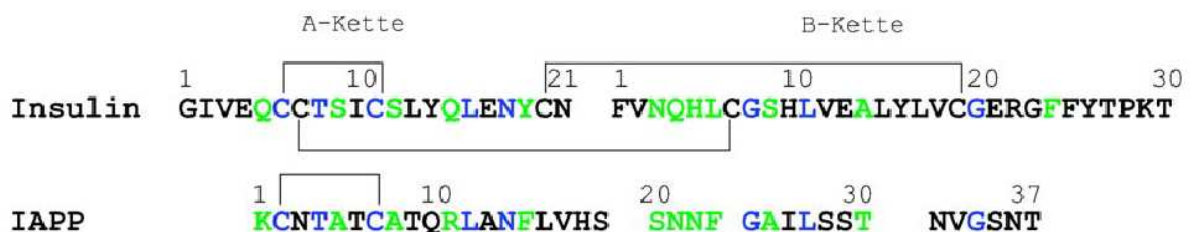


Abbildung 4.3: Primärsequenz von Insulin und IAPP. Gleiche Aminosäurereste sind in der Sequenz in blau und ähnliche in grün dargestellt. Quelle [278].

Ob umgekehrt IAPP die Insulinaggregation beeinflussen könnte, wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Da in der Arbeitsgruppe nicht-amyloide und nicht-toxische IAPP-Analoga entwickelt wurden, war es nahe liegend zu untersuchen, ob diese Moleküle einen Einfluss auf die zytotoxischen Insulinaggregation und Fibrillenbildung haben könnten. Bei hohen Konzentrationen und einem neutralen pH-Wert bildet Insulin mit Zinkionen Hexamere. In neutralen zinkfreien Lösungen liegt Insulin in Form von Tetra- und Dimeren vor. Da die Fehlfaltung und Aggregation des Insulins durch dessen Dissoziation zu Monomeren und die Bildung partiell entfalteter Intermediate induziert wird [217, 220, 258], wurden die Untersuchungen unter solchen „destabilisierenden“ Bedingungen, also Bedingungen welche die Dissoziation und Entfaltung des Insulins fördern, durchgeführt. Bei Raumtemperatur, einem pH-Wert von 2 und einer Peptidkonzentration von 10-20 μ M, kommen hauptsächlich

Monomere und Dimere des nativ gefalteten Insulins vor, welche durch die Dissoziation von Insulintetra- und hexameren gebildet werden. Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 60 °C bilden sich partiell entfaltete Monomere, welche dann zu nicht-nativen und zelltoxischen Oligomeren, Multimeren und Fibrillen aggregieren [216, 220, 258, 288].

Um festzustellen, ob IAPP und seine Analoga die Fibrillogenese von Insulin und dessen Aggregation zu toxischen Spezies unterbinden kann, wurde Insulin (10-20 µM) mit den Peptiden unter aggregationsfördernde Versuchsbedingungen (pH 2, 60 °C) inkubiert, und es wurden Thioflavin T- und MTT-Reduktionsassays bei verschiedenen Inkubationszeitpunkten durchgeführt. Anhand der Daten, wurde festgestellt, dass vor allem IAPP-GI, bei einem 10-fachen molaren Überschuss, die Fibrillenbildung und zytotoxische Aggregation einer 24 h lang gealterten Insulinlösung vollständig blockieren konnte. Der inhibitorische Effekt des IAPP-GI war nach einer Inkubationszeit von einer Woche immer noch deutlich zu sehen. Überraschenderweise bildeten die Analoga IAPP-FA und IAPP-AL unter diesen Inkubationsbedingungen – ähnlich wie IAPP – zytotoxische Spezies aus. Entsprechend war auch kein Effekt dieser Analoga auf die Bildung toxischer Insulinspezies nachzuweisen. Die Fibrillenbildung des Insulins wurde durch IAPP-FA nur teilweise unterdrückt, und in der Insulin-Mischung mit IAPP-AL war der Gehalt an Insulinfibrillen höher als in der Insulininkubation. Auch IAPP war in der Lage die Insulinaggregation zu toxischen Oligomeren und Fibrillen zu unterdrücken; jedoch war sein Effekt viel schwächer als die inhibitorische Wirkung des IAPP-GI. Zusätzlich haben diese Untersuchungen darauf hingewiesen, dass die zwei amyloiden Peptide Insulin und IAPP ihre Aggregation zu toxischen Spezies gegenseitig abschwächen können, wenn sie sich selbst am Zeitpunkt der Wechselwirkung in einem nicht-aggregierten und nicht-toxischen Zustand befinden.

Das Analogon IAPP-IL, welches wie IAPP-GI keine toxischen Aggregate unter den Insulininkubationsbedingungen gebildet hatte, konnte ähnlich wie IAPP-GI die zytotoxische Insulinaggregation inhibieren, die Entstehung der Insulinfibrillen wurde jedoch nur leicht verzögert. Die Mischung mit rIAPP – welches auch in einem nicht-toxischen und nicht-fibrillären Zustand unter den Inkubationsbedingungen von Insulin war – konnte die Insulinfibrillenbildung nur teilweise unterbinden. Nach einer 24-stündigen Inkubation konnte die Ausbildung von toxischen Insulinspezies durch rIAPP nicht mehr unterdrückt werden. In der Mischung war der Gehalt an zytotoxischen Spezies nach 24 h sogar höher als bei Insulin allein. Das kurze N-methylierte IAPP-Fragment, NFGAIL-GI, welches die toxische IAPP-Aggregation teilweise inhibieren kann, konnte im Vergleich zu der vollständigen Sequenz des Inhibitors IAPP-GI die Insulinaggregation nicht beeinflussen. Es ist zu vermuten, dass auch andere Sequenzabschnitte des IAPP-GI an der Wechselwirkung und Stabilisierung nicht-toxischer Insulinkonformationen beteiligt sind. Als Negativkontrolle wurde die Wirkung eines aus 34 Aminosäuren bestehenden Polypeptids (Parathyroidhormon, PTH) untersucht, und es stellte sich heraus, dass PTH keinen Einfluss auf die zytotoxische Insulinaggregation hatte.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass der effektivste Inhibitor unter den IAPP-Analoga, IAPP-GI, die Bildung von nicht-fibrillären Insulinoligomeren und -multimeren auch unterdrücken kann. Die inhibitorische Wirkung des IAPP war geringer als die des IAPP-GI. Die Negativkontrolle PTH hatte keinen Einfluss auf die nicht-fibrilläre Insulinaggregation, was auf die Spezifität der IAPP-GI-Wirkung hingedeutet hat.

Die Bindung von Insulin an IAPP und den IAPP-Analoga wurde mit Hilfe des Fluoreszenz-Bindungsassays untersucht. Es wurde festgestellt, dass Insulin mit allen Analoga und IAPP im nanomolaren Bereich wechselwirken kann. Da Insulin im nanomolaren Konzentrationsbereich vorzugsweise als Di- und Monomer vorliegt [220, 258], ist anzunehmen dass IAPP und die Analoga mit hoher Affinität an Insulinmonomere und/oder -dimere binden.

Die Insulin/IAPP-GI- und Insulin/IAPP-Wechselwirkungen wurden zusätzlich durch Fern-UV-CD-Spektroskopie charakterisiert. Das CD-Spektrum von Insulin (pH 2) deutete – wie es bereits in der Literatur beschrieben ist [220] – auf eine signifikante Menge an α -helikalen Anteilen hin. Das Spektrum von IAPP-GI war unter den pH 2 Bedingungen charakteristisch für ungeordnete Zustände und das Spektrum von IAPP deutet auf β -Faltblattstrukturen hin. Die CD-Spektren der Mischungen weisen darauf hin, dass IAPP-GI mit Insulin zu Heterokomplexen mit α -helikaler Konformation assoziiert. Dagegen weisen die IAPP/Insulin-Komplexe eher eine β -Faltblattstruktur auf.

Durch das Crosslinking von Insulin mit IAPP-GI wurde versucht die Größe und die Zusammensetzung der Heterokomplexe zu bestimmen. Die Ergebnisse deuten auch auf die Bildung von Insulin/IAPP-GI-Heterokomplexen, welche aus Insulin- und IAPP-GI-Monomeren oder Dimeren bestehen, hin. Eine genauere Bestimmung der Zusammensetzung der Heterokomplexe war aufgrund der ähnlichen Molekulargewichte von Insulin und IAPP-GI, und somit des ähnlichen Laufverhaltens dieser Peptide im Gel, auf der Basis dieser Ergebnisse nicht möglich.

Bereits gebildete Insulinfibrillen konnten durch einen 10-fachen Überschuss an IAPP-GI nur teilweise wieder aufgelöst werden. In Analogie zu Ergebnissen von A β -Fibrillenauflosungsstudien, wurde vermutet, dass an den Fibrillenenden ein Gleichgewicht zwischen den fibrillären Strukturen und der löslichen Monomeren bestehen könnte [279]. Somit könnte auch in diesem Fall monomeres Insulin, welches im Gleichgewicht zu den gebildeten Fibrillen steht, sich von den Fibrillenenden ablösen und mit IAPP-GI wechselwirken. Dadurch sind die an IAPP-GI gebundenen Insulinmonomere nicht mehr in der Lage an den Fibrillenenden zu binden, was wiederum dazu führen könnte, dass das Gleichgewicht in die Richtung der löslichen Insulinmonomere verschoben wird und dadurch die Insulinfibrillen aufgelöst werden. Durch die Zugabe von IAPP-GI konnte jedoch die Toxizität der fibrillierten Insulinlösung nicht beeinträchtigt werden. Das als Negativkontrolle verwendete Parathyroidhormon konnte im Vergleich zu IAPP-GI nur geringfügig die Insulinfibrillen wieder auflösen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass bereits gebildete Insulinoligomere, welche größer als dimeres Insulin waren, durch einen 10-fachen Überschuss an IAPP-GI nicht aufgelöst

wurden. Anhand des Western-Blots wurde festgestellt, dass in der Mischung mit IAPP-GI, im Gegensatz zu Insulin allein, weniger monomeres und kaum dimeres Insulin nachgewiesen wurde. Da unsere Daten darauf hingewiesen haben, dass IAPP-GI an Insulinmonomere binden könnte, ist zu vermuten, dass in diesem Fall durch die Wechselwirkung mit IAPP-GI das Insulindimer und ein Teil der entstehenden Monomere dann weiter aggregieren. Auch hier konnte die toxische Wirkung von bereits vorhandenen Insulinoligomeren durch die Zugabe von IAPP-GI nicht beeinträchtigt werden.

Zuletzt wurde untersucht, ob die Wirkung des Insulins auf seine Zielzellen durch die Insulin/IAPP-GI-Interaktion beeinflusst wird. Durch die Bindung von monomerem Insulin an den Insulinrezeptor (IR) wird eine Kaskade von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Phosphorylierungsschritten ausgelöst, wodurch die Signaltransduktion stattfindet [280-282]. Die Bioaktivitätsstudie hat gezeigt, dass trotz eines 10-fachen Überschusses an IAPP-GI, Insulin, wie in der Abwesenheit von IAPP-GI, an den Rezeptor binden und dessen β -Untereinheit autophosphorylieren kann. Auch die Phosphorylierung eines weiteren Mediators der Signalkaskade, Akt, wurde durch Insulin, in Anwesenheit von IAPP-GI, ausgelöst. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Signaltransduktion von aggregiertem im Vergleich zu nativ-gefalteten Insulinmolekülen stark beeinträchtigt ist. In der Anwesenheit eines 10-fachen Überschusses an IAPP-GI, welches die Insulinaggregation blockiert, wird jedoch die biologische Aktivität des Insulins trotz der Aggregations-induzierenden Inkubationsbedingungen (pH 2, 60 °C) beibehalten.

Studien zur Insulinaggregation unter pH 2 Bedingungen deuten darauf hin, dass Insulinmoleküle zwei hydrophobe Regionen exponieren, durch welche sie zu nicht-nativen Oligomeren und Fibrillen aggregieren können [221]. Es wurde festgestellt, dass der C-Terminus der Insulin B-Kette sehr flexibel ist, und dass ein Umklappen dieses Sequenzabschnitts (B23-B30) eine hydrophobe Domäne freisetzt (Abbildung 4.4), die in nativ gefalteten Insulindimeren verborgen ist. Zusätzlich deuten Daten aus *in vitro* Studien darauf hin, dass die Interaktion mit dem Insulinrezeptor an diese freigesetzte Domäne stattfindet [221]. Der zweite hydrophobe Sequenzabschnitt, welcher an der Insulinaggregation beteiligt sein könnte, wird bei der natürlichen Assoziation von nativ-gefalteten Dimeren zu Hexameren verborgen. Daraus ist zu schließen, dass durch die Oligomerisierung von nativ-gefalteten Dimeren zu Hexameren nicht nur die Bioaktivität des Insulins reguliert wird, sondern auch dessen Aggregation unterbunden wird. Des Weiteren wurde bereits eine Interaktion zwischen dem IAPP-Sequenzabschnitt 13-17 (ANFLV) und der Insulin B-Kette (B14-18: ALYLV) nachgewiesen (4 μ M, pH 6,5) [252]. Unsere Daten sprechen dafür, dass IAPP-GI an nativ-gefaltete Insulinmono- und dimere binden kann, bevor die Insulinmissfaltung durch die Freisetzung der hydrophoben Domäne stattfindet. Eine Bindung von IAPP-GI an die B-Kette (B14-18) der Insulinmoleküle, könnte diesen Sequenzabschnitt abschirmen und dadurch die Anlagerung weiterer Insulinmoleküle supprimieren (Abbildung 4.4).

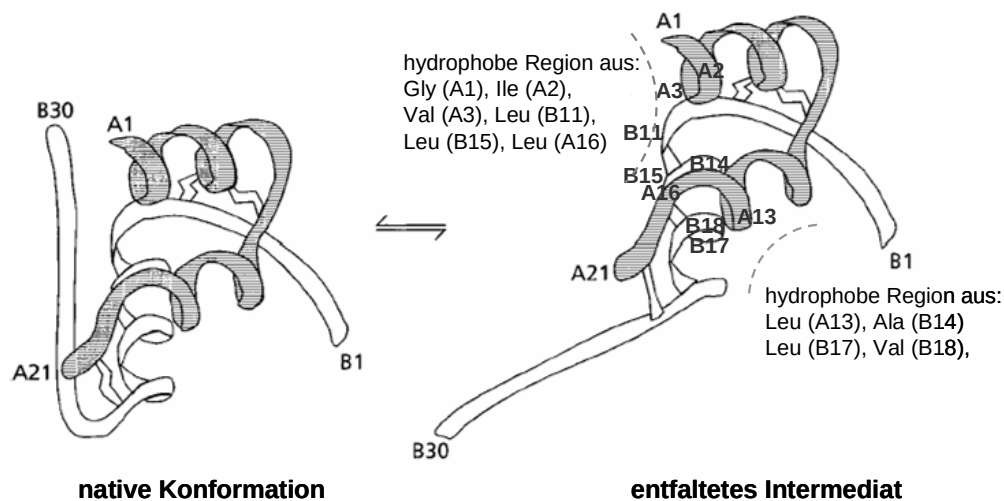


Abbildung 4.4: Entfaltung nativer Insulinmonomere. Dargestellt sind die hydrophoben Regionen an denen Insulin zur Ausbildung nicht-nativer Aggregate assoziieren kann. A = Insulin A-Kette, B = Insulin B-Kette. Quelle: [221]; die Abbildung wurde ergänzt nach [214].

In der hier vorgestellten Studie wurde gezeigt, dass IAPP-GI mit einer Aktivität im nanomolaren Bereich nicht nur die Insulin-Fibrillogenese, sondern auch dessen zytotoxische Oligomerisierung blockieren kann, ohne die biologischen Aktivität des Insulins zu beeinflussen. Wie in Abbildung 4.5 gezeigt, geht man davon aus, dass partiell entfaltete Insulinmono- und Dimere [217] die Vorstufen der Insulinaggregate darstellen könnten. Durch die hochaffine Bindung von IAPP-GI an nicht-toxische Insulin-Spezies (wahrscheinlich native Mono- oder Dimere), wird deren Konformation stabilisiert und eine Aggregation zu zytotoxischen Insulin-Oligomeren und Fibrillen unterbunden.

Wie bereits erwähnt stellt IAPP-GI nicht nur eine nicht-toxische und nicht-amyloide IAPP-Konformation dar, sondern es ist auch ein IAPP-Rezeptoragonist [97]. Da bei Typ II-Diabetikern durch die Zerstörung der β -Zellen, nicht nur die Insulin-, sondern auch die IAPP-Produktion unterbunden ist, könnte ein Therapeutikum bestehend aus IAPP-GI und Insulin, zum einen den Mangel dieser Hormone ausgleichen und zum anderen die Stabilität an aktivem Insulin durch IAPP-GI gewährleisten. Lösliche IAPP-Analoga und Rezeptoragonisten sind bereits für die Behandlung von Typ II-Diabetes zusammen mit Insulin zugelassen [283, 284]. Ob solche multifunktionellen Substanzen wie IAPP-GI bei der Behandlung von Typ II-Diabetes nützlich sein könnten, muss nun durch weitere Studien untersucht werden.

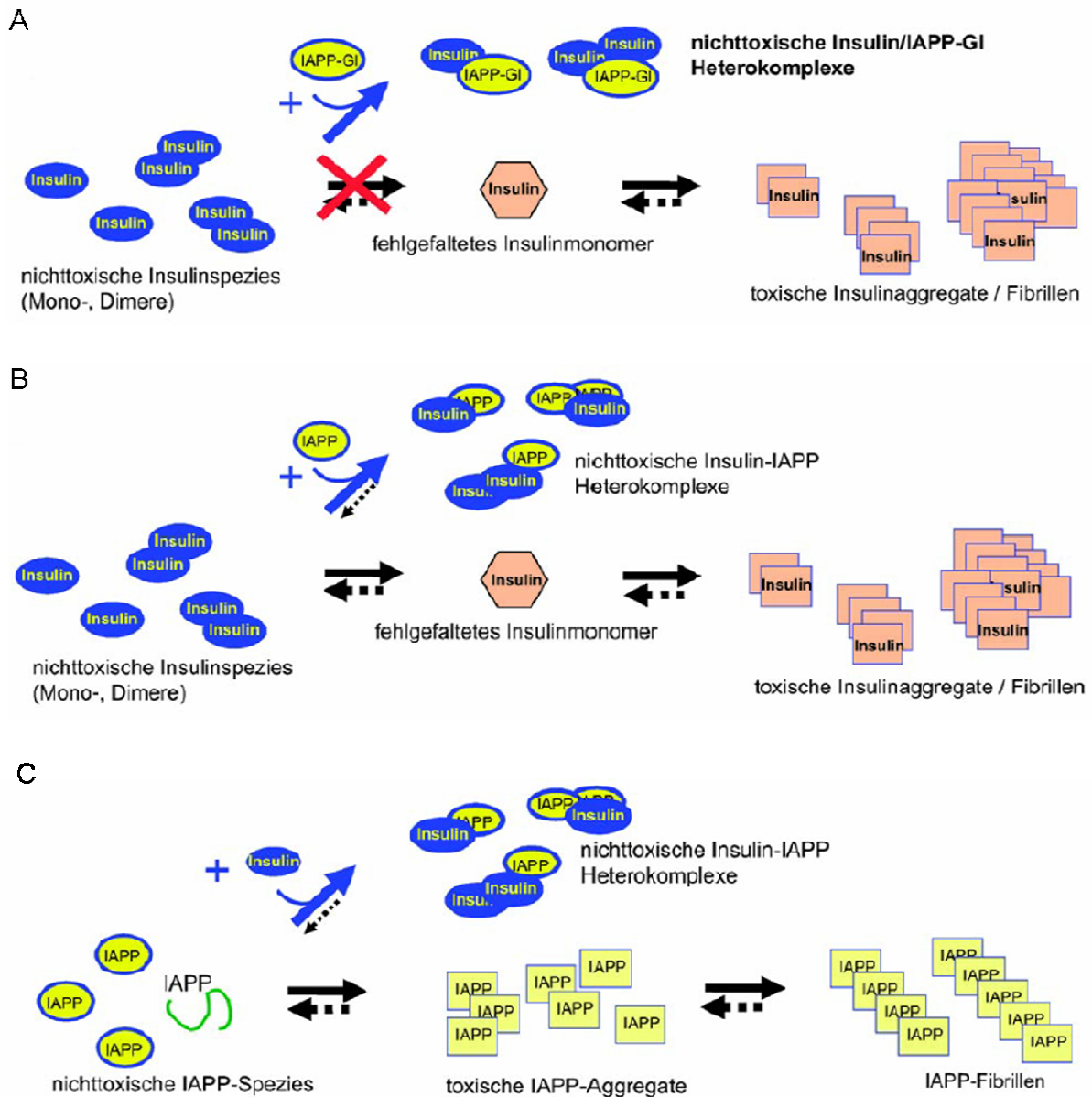


Abbildung 4.5: Modell der Insulinaggregation und die Inhibierung durch IAPP-GI und einem nicht-toxischen IAPP-Konformer [278]. (A) Nativ-gefaltete, nicht-fibrilläre und nicht-toxische Insulinspezies (Monomere und/oder Dimere) können mit IAPP-GI zu stabilen nicht-toxischen Heterokomplexen assoziieren, wodurch die Fehlfaltung und Selbstassoziation von Insulin unterdrückt wird. (B) Nicht-toxische und nicht-fibrilläre IAPP-Moleküle können mit Insulin wechselwirken und das Insulin in Form nicht-zytotoxischer Heterokomplexe aus seinem Aggregationsweg entziehen. (C) Die Wechselwirkung von nicht-toxischen und nicht-fibrillären Insulin- und IAPP-Spezies führt zur Verlangsamung der toxischen Aggregation von IAPP.

In dieser Arbeit, sowie in weiteren Studien der Arbeitsgruppe [96, 269], wurde zusätzlich gezeigt, dass die beiden amyloiden Peptide A β (1-40) und IAPP, sowie Insulin und IAPP, in einem nicht-aggregierten und nicht-toxischen Zustand miteinander wechselwirken und dadurch ihre Aggregation gegenseitig verlangsamen können. Diese Daten führen zu der Hypothese, dass „Amyloid-Kreuzwechselwirkungen“ vor der pathologischen *in vivo*-Selbstassoziation dieser Polypeptide schützen könnten. Falls solche Wechselwirkungen amyloider Peptide tatsächlich *in vivo* existieren, würden sie eine wichtige Verbindung

zwischen der Alzheimer-Krankheit und des Typ II-Diabetes auf molekularer Ebene darstellen [285].

Da in dieser Arbeit und in anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zusätzlich festgestellt wurde, dass IAPP-GI auch die zytotoxische Selbstassoziation von A β (1-40) im nanomolaren Bereich blockieren kann [269] und bereits gezeigt wurde, dass IAPP die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann [286], stellt dieses Molekül einen potentiellen Kandidaten bei der Entwicklung von Therapeutika gegen die Alzheimer-Krankheit dar.

IAPP-GI ist bisher der einzige bekannte Peptidabkömmling, der drei verschiedene amyloide Polypeptide mit nanomolarer Affinität binden und ihrer Selbstassoziation zu zytotoxischen Spezies und Fibrillen inhibieren kann. Somit ist IAPP ein guter Kandidat für die Entwicklung von Inhibitoren gegen Proteinaggregationen, welche möglicherweise eine Anwendung bei der Behandlung der Amyloid-Krankheiten Typ-II Diabetes und Alzheimer-Demenz finden könnten. Des Weiteren könnte die hier vorgestellte Strategie zur Entwicklung von inhibitorischen Molekülen, welche die biologische Funktion des Proteins nicht beeinträchtigen, möglicherweise auch bei anderen zur Fehlfaltung und Aggregation neigenden bioaktiven Polypeptiden und Proteinen angewendet werden.

5 Zusammenfassung

Die Neigung von Polypeptiden zur Fehlfaltung und Aggregation ist nicht mit vielen noch unheilbaren Krankheiten wie die Alzheimer-Erkrankung und der Typ II-Diabetes assoziiert, sondern erschwert auch die Produktion, Lagerung und Anwendung Protein-basierter Therapeutika. Ein Beispiel hierfür ist das Insulin, welches zu den am meisten verwendeten biopharmazeutischen Produkten zählt. Um den Proteinaggregationsprozess zu blockieren, können inhibitorische Moleküle verwendet werden, welche an das zur Missfaltung neigende Polypeptid binden und seine Konformation stabilisieren können.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits ein Inhibitor gegen die zytotoxische Selbstassoziation und Fibrillenbildung des Inselamyloid-Polypeptids (IAPP) entwickelt und untersucht. Toxische Aggregate des IAPP zerstören die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse und unterbinden somit die Insulinproduktion, was mit dem Krankheitsbild des Typ II-Diabetes eng zusammenhängt. Der entwickelte Inhibitor ist ein Analogon des IAPP, welches eine nicht-amyloide und nicht-toxische IAPP-Konformation nachahmt. Die eingeschränkte Flexibilität des IAPP-Analogon wurde durch N-Methylierung zweier Amidbindungen in einer der IAPP-Kernsequenzen (IAPP(22-27): NFGAIL) erreicht. Diese Sequenz soll bei der intermolekularen IAPP-Selbsterkennung und somit für seine Selbstassoziation eine wichtige Rolle spielen. Die eingeführten N-Methylreste der Amidbindungen des Inhibitors IAPP-GI befinden sich an den Aminosäuren Glycin 24 und Isoleucin 26. Weitere IAPP-Analoga mit N-Methylierungen an unterschiedlichen Positionen in der Kernsequenz (22-27), nämlich IAPP-FA (N-Methylierung an Phenylalanin 23 und Alanin 25), IAPP-AL (N-Methylierung an Alanin 25 und Leucin 27) und IAPP-IL (N-Methylierung an Isoleucin 26 und Leucin 27), hatten im Vergleich zu IAPP-GI, schwächere inhibitorische Wirkungen auf die IAPP-Aggregation.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie die Selbst- und Heteroassoziation des IAPP und der IAPP-Analoga untersucht. Die Messungen ergaben, dass sowohl IAPP als auch die Analoga, trotz der N-Methylierungen in einer der Kernsequenzen, im unteren nanomolaren Bereich mit sich selbst assoziieren können. Jedoch unterschieden sich die N-methylierten Analoga von IAPP stark im Bezug auf ihre Amyloidbildungsfähigkeit und Löslichkeit. Obwohl IAPP schon in nanomolaren Konzentrationen zu toxischen Aggregate und Fibrillen assoziieren kann, bilden die N-methylierten Analoga nur lösliche und nicht-toxische Oligomere unter physiologischen pH-Bedingungen.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass alle Analoga mit hoher Affinität an IAPP binden. Diese Daten deuten darauf hin, dass auch andere IAPP-Sequenzen wie z. B. IAPP (10-18) und (30-37) an der Selbstassoziation der Analoga und der Wechselwirkung mit IAPP beteiligt sind. Der schwächere Einfluss der Analoga IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL, im Vergleich

zum Effekt von IAPP-GI, auf die IAPP-Aggregation, ist somit nicht auf eine schwächere Bindung an IAPP zurückzuführen.

Auf der Basis kürzlich präsentierter klinischer und pathophysiologischer Hinweise, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Typ II-Diabetes und der Alzheimer-Krankheit geben könnte, der Beobachtung, dass die Schlüsselveptide dieser zwei Proteinmissfaltungskrankheiten eine hohe Homologie in den Amyloidkernsequenzen aufweisen und des Befundes, dass A β -Fibrillen die initiierte Aggregation von IAPP beschleunigen können, wurde in dieser Arbeit auch die Wirkung der obigen IAPP-Analoga auf die zytotoxische Aggregation der Amyloid- β -Peptide A β (1-40) und A β (1-42) der Alzheimer-Krankheit untersucht.

Die Daten dieser Studie zeigen, dass alle IAPP-Analoga und vor allem IAPP-GI mit einer hohen Affinität an A β (1-40) binden und dessen Selbstassoziation zu toxischen Spezies mit einer Aktivität im nanomolaren Bereich inhibieren können. Die inhibitorische Wirkung der Analoga IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL ist im Vergleich zu IAPP-GI schwächer, aber immer noch signifikant.

Zusätzlich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die amyloiden Peptide IAPP und A β (1-40) wechselwirken, nicht-toxische Heterokomplexe bilden und teilweise ihre Aggregation gegenseitig abschwächen können. Die gebildeten A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe wurden untersucht und erwiesen sind als instabil. Daraus lässt sich schließen, dass aufgrund der starken Selbstassoziationsneigung beider Polypeptide, diese Heterokomplexe dissoziieren könnten, so dass jedes Peptid mit sich selbst Fibrillen ausbilden kann, oder dass die A β (1-40)/IAPP-Heterokomplexe zu multimeren Heteroaggregaten und gemischten Fibrillen weiter aggregieren können. Dagegen können A β (1-40)/IAPP-GI-Heterokomplexe wegen der N-Methylierung des IAPP-GI nicht mehr eine β -Faltblattstruktur ausbilden, die zu einer zytotoxischen Selbstassoziation und Fibrillogenese des A β (1-40) führen würde.

IAPP-GI konnte auch im nanomolaren Bereich mit A β (1-42) wechselwirken. Diese zytotoxische Aggregation von A β (1-42) konnte jedoch nicht beeinträchtigt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass A β (1-42) eine höhere Aggregationsneigung und Toxizität als A β (1-40) aufweist. Es wurde auch gezeigt, dass A β (1-40) und A β (1-42) über unterschiedliche Wege oligomerisieren. Somit wäre es möglich, dass die Bindungsaffinität von IAPP-GI an A β (1-42) nicht genügt, um die A β (1-42)-Selbstassoziation zu überwinden. Alternativ dazu könnte A β (1-42) fehlgefaltete Konformationen und Aggregate bilden, welche von IAPP-GI nicht erkannt werden.

IAPP weist nicht nur mit A β , sondern auch mit Insulin eine beachtliche Sequenzähnlichkeit auf. Die Sequenzabschnitte an denen die IAPP/Insulin-Bindung stattfindet, wurden bereits charakterisiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass Insulin ein Inhibitor der IAPP-Fibrillenbildung ist. Aufgrund dieser Befunde wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob umgekehrt IAPP und seine Analoga die Insulinaggregation beeinflussen können. Auch hier konnte

IAPP-GI, nicht nur die Insulin-Fibrillogenese, sondern auch seine zytotoxische Oligomerisierung abschwächen, ohne dabei die biologische Wirkung des Insulinmoleküls zu beeinflussen. Frisch gelöstes IAPP und die Analoga IAPP-FA, IAPP-AL und IAPP-IL konnten nur teilweise die Insulinaggregation unterdrücken. Diese Daten deuten auf eine klare konformationelle Spezifität der Insulin/IAPP- bzw. Insulin/IAPP-Analoga-Wechselwirkung hin, welche zur Inhibierung der Insulinaggregation führt.

Andere Studien der Arbeitsgruppe haben IAPP-GI bereits als einen hochwirksamen IAPP-Inhibitor und IAPP-Rezeptoragonisten charakterisiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IAPP-GI auch A β und Insulin mit einer hohen Affinität binden kann. Des Weiteren haben die Daten dieser und anderer Arbeiten [269] gezeigt, dass IAPP-GI die Aggregation beider Peptide zu zytotoxischen Oligomeren und Fibrillen inhibieren kann. Ob IAPP-GI in Kombination mit Insulin als Therapeutikum bei Typ II-Diabetes geeignet ist, muss nun durch weitere Studien geprüft werden. Weiterhin muss untersucht werden, ob dieses multifunktionelle Molekül auch als Inhibitor der Aggregation von A β (1-40) eingesetzt werden und somit möglicherweise bei der Behandlung der Alzheimer-Demenz eine Anwendung finden könnte.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Das Biotech Life Science Portal Baden-Württemberg (BIOPRO), *Hin zu einer transdisziplinären Altersforschung*. Erhältlich im Internet unter: <http://www.bio-pro.de/de/life/thema/02647/index.html> [13.09.06].
- [2] Das Biotech Life Science Portal Baden-Württemberg (BIOPRO), *Altern - Schicksal oder Krankheit?* Erhältlich im Internet unter: <http://www.bio-pro.de/de/region/rhein/magazin/02653/index.html> [21.09.06]
- [3] Nelson D, Cox M. *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage. Springer-Verlag. 2001.
- [4] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. 2003.
- [5] Anfinsen B, Haber E. *Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds*. J Biol Chem, 1961. 236: 1361-3.
- [6] Levinthal C. *Are there pathways for protein folding?* J Chim Phys. 1968; 65: 44–45
- [7] Kubelka J, Hofrichter J, Eaton WA. *The protein folding 'speed limit'*. Curr. Opin. Struct. Biol. 2004; 14: 76-88.
- [8] Chen Y, Ding F, Nie H, Serohijos AW, Sharma S, Wilcox KC, Yin S, Dokholyan NV. *Protein folding: then and now*. Arch Biochem Biophys. 2008; 469(1): 4-19.
- [9] Ptitsyn OB, Rashin AA. *A model of myoglobin self-organization*. Biophys Chem. 1975; 3(1): 1-20.
- [10] Dill KA. *Theory for the folding and stability of globular proteins*. Biochemistry. 1985; 24(6): 1501-9.
- [11] Fersht AR, Matouschek A, Sancho J, Serrano L, Vuilleumier S. *Pathway of protein folding*. Faraday Discuss. 1992; 93: 183-93.
- [12] Dill KA, Chan HS. *From Levinthal to pathways to funnels*. Nat Struct Biol. 1997; 4(1): 10-9.
- [13] Brooks CL 3rd, Gruebele M, Onuchic JN, Wolynes PG. *Chemical physics of protein folding*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(19): 11037-8.
- [14] Klein-Seetharaman J, Oikawa M, Grimshaw SB, Wirmer J, Duchardt E, Ueda T, Imoto T, Smith LJ, Dobson CM, Schwalbe H. *Long-range interactions within a nonnative protein*. Science. 2002; 295(5560): 1719-22.
- [15] Le Duff CS, Whittaker SB, Radford SE, Moore GR. *Characterisation of the conformational properties of urea-unfolded Im7: implications for the early stages of protein folding*. J Mol Biol. 2006; 364(4): 824-35.
- [16] Wildes D, Anderson LM, Sabogal A, Marqusee S. *Native state energetics of the Src SH2 domain: evidence for a partially structured state in the denatured ensemble*. Protein Sci. 2006; 15(7): 1769-79.
- [17] Anil B, Li Y, Cho JH, Raleigh DP. *The unfolded state of NTL9 is compact in the absence of denaturant*. Biochemistry. 2006; 45(33): 10110-16.
- [18] Polverino de Laureto P, Taddei N, Frare E, Capanni C, Costantini S, Zurdo J, Chiti F, Dobson CM, Fontana A. *Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis*. J Mol Biol. 2003; 334(1): 129-41.
- [19] Mishima T, Ohkuri T, Monji A, Imoto T, Ueda T. *Amyloid formation in denatured single-mutant lysozymes where residual structures are modulated*. Protein Sci. 2006; 15(10): 2448-52.

- [20] Jahn TR, Radford SE. *The Yin and Yang of protein folding*. FEBS J. 2005; 272(23): 5962-70.
- [21] Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, Hartl FU. *Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases*. Semin Cell Dev Biol. 2004; 15(1): 17-29.
- [22] Hartl FU, Hayer-Hartl M. *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science. 2002; 295(5561): 1852-8.
- [23] Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. *Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5(10): 781-91.
- [24] Jahn TR, Radford SE. *Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways*. Arch Biochem Biophys. 2008; 469(1): 100-17.
- [25] Schiene C, Fischer G. *Enzymes that catalyse the restructuring of proteins*. Curr Opin Struct Biol. 2000; 10(1): 40-5.
- [26] Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. *Amyloid peptides and proteins in review*. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2007; 159: 1-77.
- [27] Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. *Toxic proteins in neurodegenerative disease*. Science. 2002; 296(5575): 1991-5.
- [28] Soto C. *Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci. 2003; 4(1): 49-60.
- [29] Caughey B, Lansbury PT. *Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders*. Annu Rev Neurosci. 2003; 26: 267-98.
- [30] Stromer T, Serpell LC. *Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril*. Microsc Res Tech. 2005; 67(3-4): 210-7.
- [31] Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC. *Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction*. J Mol Biol. 1997; 273(3): 729-39.
- [32] O'Nuallain B, Wetzel R. *Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(3): 1485-90.
- [33] Cohen AS, Calkins E. *Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins*. Nature. 1959; 183(4669): 1202-3.
- [34] Shirahama T, Cohen AS. *High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril*. J Cell Biol. 1967 Jun;33(3):679-708.
- [35] Sunde M, Blake C. *The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction*. Adv Protein Chem. 1997 ;50: 123-59.
- [36] Stine WB Jr, Snyder SW, Lador US, Wade WS, Miller MF, Perun TJ, Holzman TF, Krafft GA. *The nanometer-scale structure of amyloid-beta visualized by atomic force microscopy*. J Protein Chem. 1996; 15(2): 193-203.
- [37] Serpell LC, Blake CC, Fraser PE. *Molecular structure of a fibrillar Alzheimer's A beta fragment*. Biochemistry. 2000; 39(43): 13269-75.
- [38] Serpell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB, Fraser PE. *The protofilament substructure of amyloid fibrils*. J Mol Biol. 2000; 300(5): 1033-9.
- [39] Eanes ED, Glenner GG. *X-ray diffraction studies on amyloid filaments*. J Histochem Cytochem. 1968; 16(11): 673-7.
- [40] Dobson CM. *Principles of protein folding, misfolding and aggregation*. Semin Cell Dev Biol. 2004; 15(1): 3-16.
- [41] Klunk WE, Pettegrew JW, Abraham DJ. *Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation*. J Histochem Cytochem. 1989; 37(8): 1273-81.

- [42] Puchtler H, Sweat F. *Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid*. J Histochem Cytochem. 1965; 13(8): 693-4.
- [43] Rogers DR. *Screening for amyloid with the Thioflavin-T fluorescent method*. Am J Clin Pathol. 1965; 44: 59-61
- [44] LeVine H 3rd. *Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T*. Methods Enzymol. 1999; 309: 274-84.
- [45] Harper JD, Lansbury PT Jr. *Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins*. Annu Rev Biochem. 1997; 66: 385-407.
- [46] Inouye H, Kirschner DA. *A beta fibrillogenesis: kinetic parameters for fibril formation from congo red binding*. J Struct Biol. 2000; 130(2-3): 123-9.
- [47] Murphy RM. *Peptide aggregation in neurodegenerative disease*. Annu Rev Biomed Eng. 2002; 4: 155-74.
- [48] Pallitto MM, Murphy RM. *A mathematical model of the kinetics of beta-amyloid fibril growth from the denatured state*. Biophys J. 2001; 81(3): 1805-22.
- [49] Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM, Stefani M. *Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases*. Nature. 2002; 416(6880): 507-11.
- [50] Novitskaya V, Bocharova OV, Bronstein I, Baskakov IV. *Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons*. J Biol Chem. 2006; 281(19): 13828-36.
- [51] Kaylor J, Bodner N, Edridge S, Yamin G, Hong DP, Fink AL. *Characterization of oligomeric intermediates in alpha-synuclein fibrillation: FRET studies of Y125W/Y133F/Y136F alpha-synuclein*. J Mol Biol. 2005; 353(2): 357-72.
- [52] Dusa A, Kaylor J, Edridge S, Bodner N, Hong DP, Fink AL. *Characterization of oligomers during alpha-synuclein aggregation using intrinsic tryptophan fluorescence*. Biochemistry. 2006; 45(8): 2752-60.
- [53] Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science. 2003; 300(5618): 486-9.
- [54] Pschyrembel W. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Verlag de Gruyter. 1998
- [55] Jayasinghe SA, Langen R. *Membrane interaction of islet amyloid polypeptide*. Biochim Biophys Acta. 2007; 1768(8): 2002-9.
- [56] O'Brien TD, Westermark P, Johnson KH. *Islet amyloid polypeptide and insulin secretion from isolated perfused pancreas of fed, fasted, glucose-treated, and dexamethasone-treated rats*. Diabetes. 1991; 40(12): 1701-6.
- [57] Sanke T, Bell GI, Sample C, Rubenstein AH, Steiner DF. *An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing*. J Biol Chem. 1988; 263(33): 17243-6.
- [58] Kapurniotu A. *Amyloidogenicity and cytotoxicity of Islet amyloid polypeptide*. Biopolymers (Peptide Science). 2001; 60: 438-59
- [59] Nishi M, Sanke T, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF. *Islet amyloid polypeptide. A new beta cell secretory product related to islet amyloid deposits*. J Biol Chem. 1990; 265(8): 4173-6.
- [60] Krampert M, Bernhagen J, Schmucker J, Horn A, Schmauder A, Brunner H, Voelter W, Kapurniotu A. *Amyloidogenicity of recombinant human pro-islet amyloid polypeptide (ProIAPP)*. Chem Biol. 2000; 7(11): 855-71.

- [61] Westermark P, Li ZC, Westermark GT, Leckström A, Steiner DF. *Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation*. FEBS Lett. 1996; 379(3): 203-6.
- [62] Janciauskiene S, Eriksson S, Carlemalm E, Ahrén B. *B cell granule peptides affect human islet amyloid polypeptide (IAPP) fibril formation in vitro*. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 236(3): 580-5.
- [63] Roberts AN, Leighton B, Todd JA, Cockburn D, Schofield PN, Sutton R, Holt S, Boyd Y, Day AJ, Foot EA, et al. *Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86(24): 9662-6.
- [64] Lutz T. *Regulation der Nahrungsaufnahme durch Amylin und verwandte Peptide*. Schweiz Med. Forum. 2002; 40: 958-602
- [65] Opie EL. *On the relation of the chronic interstitial pancreatitis to the islands of Langerhans and to diabetes mellitus*. J Exp Med. 1900; 419: 397-428
- [66] Westermark P, Wernstedt C, O'Brien TD, Hayden DW, Johnson KH. *Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone*. Am J Pathol. 1987; 127(3): 414-7.
- [67] Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB. *Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84(23): 8628-32.
- [68] Chou PY, Fasman GD. *Empirical predictions of protein conformation*. Annu Rev Biochem. 1978; 47: 251-76.
- [69] Richardson JS. *The anatomy and taxonomy of protein structure*. Adv Protein Chem. 1981; 34: 167-339.
- [70] Seino S. *S20G mutation of the amylin gene is associated with Type II diabetes in Japanese*. Study Group of Comprehensive Analysis of Genetic Factors in Diabetes Mellitus. Diabetologia. 2001; 44(7): 906-9.
- [71] Johnson KH, O'Brien TD, Betsholtz C, Westermark P. *Islet amyloid polypeptide: mechanisms of amyloidogenesis in the pancreatic islets and potential roles in diabetes mellitus*. Lab Invest. 1992; 66(5): 522-35.
- [72] Butler AE, Jang J, Gurlo T, Carty MD, Soeller WC, Butler PC. *Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes*. Diabetes. 2004; 53(6): 1509-16.
- [73] Höppener JW, Oosterwijk C, Nieuwenhuis MG, Posthuma G, Thijssen JH, Vroom TM, Ahrén B, Lips CJ. *Extensive islet amyloid formation is induced by development of Type II diabetes mellitus and contributes to its progression: pathogenesis of diabetes in a mouse model*. Diabetologia. 1999; 42(4): 427-34.
- [74] Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. *Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid*. Diabetes. 2003; 52(9): 2304-14.
- [75] Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA. *Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus*. Nature. 1994; 368(6473): 756-60.
- [76] Wimalawansa SJ. *Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily*. Crit Rev Neurobiol. 1997; 11(2-3): 167-239.
- [77] Westermark P, Engström U, Johnson KH, Westermark GT, Betsholtz C. *Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(13): 5036-40.
- [78] Khemtémourian L, Killian JA, Höppener JW, Engel MF. *Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus*. Exp Diabetes Res. 2008; 2008: 1-9.

- [79] Kaye R, Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W, Kapurniotu A. *Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro*. J Mol Biol. 1999;287(4): 781-96
- [80] McLean LR, Balasubramaniam A. *Promotion of beta-structure by interaction of diabetes associated polypeptide (amylin) with phosphatidylcholine*. Biochim Biophys Acta. 1992; 1122(3): 317-20.
- [81] Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. *The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles*. Diabetes. 1999; 48(3): 491-8.
- [82] Anguiano M, Nowak RJ, Lansbury PT Jr. *Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes*. Biochemistry. 2002; 41(38): 11338-43.
- [83] Green JD, Goldsberry C, Kistler J, Cooper GJ, Aepli U. *Human amylin oligomer growth and fibril elongation define two distinct phases in amyloid formation*. J Biol Chem. 2004; 279(13): 12206-12.
- [84] Kaye R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG. *Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases*. J Biol Chem. 2004; 279(45): 46363-6.
- [85] Glenner GG, Eanes ED, Wiley CA. *Amyloid fibrils formed from a segment of the pancreatic islet amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun. 1988; 155(2): 608-14.
- [86] Mazar Y, Gilead S, Benhar I, Gazit E. *Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide*. J Mol Biol. 2002; 322(5): 1013-24.
- [87] Scrocchi LA, Ha K, Chen Y, Wu L, Wang F, Fraser PE. *Identification of minimal peptide sequences in the (8-20) domain of human islet amyloid polypeptide involved in fibrillogenesis*. J Struct Biol. 2003; 141(3): 218-27.
- [88] Padrick SB, Miranker AD. *Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis*. Biochemistry. 2002; 41(14): 4694-703.
- [89] Gellermann GP, Appel TR, Tannert A, Radestock A, Hortschansky P, Schroeckh V, Leisner C, Lütkepohl T, Shtrasburg S, Röcken C, Pras M, Linke RP, Diekmann S, Fändrich M. *Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(18): 6297-302.
- [90] Hiddinga HJ, Eberhardt NL. *Intracellular amyloidogenesis by human islet amyloid polypeptide induces apoptosis in COS-1 cells*. Am J Pathol. 1999; 154(4): 1077-88.
- [91] Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, Butler PC. *Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis*. Endocr Rev. 2008; 29(3): 303-16.
- [92] Tenidis K, Waldner M, Bernhagen J, Fischle W, Bergmann M, Weber M, Merkle ML, Voelter W, Brunner H, Kapurniotu A. *Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties*. J Mol Biol. 2000; 295(4): 1055-71.
- [93] Kapurniotu A, Schmauder A, Tenidis K. *Structure-based design and study of non-amyloidogenic, double N-methylated IAPP amyloid core sequences as inhibitors of IAPP amyloid formation and cytotoxicity*. J Mol Biol. 2002; 315(3): 339-50.
- [94] Tatarek-Nossol M, Yan LM, Schmauder A, Tenidis K, Westermark G, Kapurniotu A. *Inhibition of hIAPP amyloid-fibril formation and apoptotic cell death by a designed hIAPP amyloid- core-containing hexapeptide*. Chem Biol. 2005; 12(7): 797-809.
- [95] Kazantzis A. Dissertation: Solid-phase syntheses and studies of conformationally constrained analogues of the calcitonin gene peptide superfamily polypeptides calcitonin (Ct) and islet amyloid polypeptide (IAPP). 2004

- [96] Yan LM. Dissertation: Identification and characterization of IAPP-derived inhibitors of cytotoxic self-assembly and amyloidogenesis of islet amyloid polypeptide (IAPP) and β -amyloid peptide (A β). 2008
- [97] Yan LM, Tatarek-Nossol M, Velkova A, Kazantzis A, Kapurniotu A. *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. 2006; 103(7): 2046-51.
- [98] Gilead S, Gazit E. *Inhibition of amyloid fibril formation by peptide analogues modified with alpha-aminoisobutyric acid*. Angew Chem Int Ed Engl. 2004; 43(31): 4041-4.
- [99] Deutsche Alzheimer Gesellschaft. *Die Epidemiologie der Demenz*. Erhältlich im Internet unter: <http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01.pdf> [Juni 2008]
- [100] Alzheimer A. *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin. 1907; 64: 146-8.
- [101] Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. *The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis*. Appl Pathol. 1984; 2(6): 357-69.
- [102] Wilson DM, Binder LI. *Polymerization of microtubule-associated protein tau under near-physiological conditions*. J Biol Chem. 1995; 270(41): 24306-14.
- [103] Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. *Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein*. Ann N Y Acad Sci. 1996; 777: 96-106.
- [104] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83(13): 4913-7.
- [105] Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Davies P, Mandelkow E. *A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(26): 15712-7.
- [106] Khachaturian ZS. *Diagnosis of Alzheimer's disease*. Arch Neurol. 1985; 42(11): 1097-105.
- [107] Glenner GG, Wong CW. *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun. 1984; 120(3): 885-90.
- [108] Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ. *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. Nature. 1992; 359(6393): 322-5.
- [109] Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. *Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(5): 2092-6.
- [110] Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. *Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing*. Science. 1992; 258(5079): 126-9.
- [111] Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, et al. *Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide*. Nature. 1993; 361(6409): 260-3.
- [112] Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. *APP processing and synaptic function*. Neuron. 2003; 37(6): 925-37.
- [113] Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature. 1987; 325(6106): 733-6.
- [114] Selkoe DJ. *The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease*. Trends Cell Biol. 1998; 8(11): 447-53.

- [115] De Strooper B, Annaert W. *Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein*. J Cell Sci. 2000; 113: 1857-70.
- [116] Zheng H, Koo EH. *The amyloid precursor protein: beyond amyloid*. Mol Neurodegener. 2006; 1: 1-12
- [117] Storey E, Beyreuther K, Masters CL. *Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components*. Brain Res. 1996; 735(2): 217-31.
- [118] McLoughlin DM, Miller CC. *The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system*. FEBS Lett. 1996; 397(2-3): 197-200.
- [119] Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. *The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement*. J Cell Biol. 2001; 153(7): 1403-14.
- [120] Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL. *Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(4): 1561-5.
- [121] Morin PJ, Abraham CR, Amaratunga A, Johnson RJ, Huber G, Sandell JH, Fine RE. *Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized*. J Neurochem. 1993; 61(2): 464-73.
- [122] Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, Goldstein LS. *Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I*. Neuron. 2000; 28(2): 449-59.
- [123] Golde TE, Cai XD, Shoji M, Younkin SG. *Production of amyloid beta protein from normal amyloid beta-protein precursor (beta APP) and the mutated beta APPS linked to familial Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci. 1993; 695: 103-8.
- [124] De Strooper B. *Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex*. Neuron. 2003; 38(1): 9-12.
- [125] Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T. *The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex*. Nature. 2003; 422(6930): 438-41.
- [126] Borchardt T, Camakaris J, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G. *Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion*. Biochem J. 1999; 344: 461-7.
- [127] Roberson ED, Mucke L. *100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease*. Science. 2006; 314(5800): 781-4.
- [128] Sengupta P, Garai K, Sahoo B, Shi Y, Callaway DJ, Maiti S. *The amyloid beta peptide (A β (1-40)) is thermodynamically soluble at physiological concentrations*. Biochemistry. 2003; 42(35): 10506-13.
- [129] Teplow DB. *Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis*. Amyloid. 1998; 5(2): 121-42.
- [130] Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. *An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants*. Science. 1994; 264(5163): 1336-40.
- [131] Klein AM, Kowall NW, Ferrante RJ. *Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex*. Ann N Y Acad Sci. 1999; 893: 314-20.
- [132] Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. *Amyloid beta - protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(1): 330-5.

- [133] Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PT, Zagorski MG. *Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra.* J Mol Biol. 1992; 225(4): 1075-93.
- [134] Soto C, Castaño EM, Frangione B, Inestrosa NC. *The alpha-helical to beta-strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation.* J Biol Chem. 1995; 270(7): 3063-7.
- [135] Tjernberg LO, Näslund J, Lindqvist F, Johansson J, Karlström AR, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C. *Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand.* J Biol Chem. 1996; 271(15): 8545-8.
- [136] Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. *A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(26): 16742-7.
- [137] Hardy JA, Higgins GA. *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.* Science. 1992; 256(5054): 184-5.
- [138] Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. *APP^{Sw} transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1.* J Neuropathol Exp Neurol. 1997; 56(9): 965-73.
- [139] Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT. *Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse.* J Neurosci. 1997; 17(18): 7053-9.
- [140] Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussière T, Bouras C, Kövari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR. *Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease.* Neurology. 2003; 60(9): 1495-500.
- [141] Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF, et al. *Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress.* Exp Neurol. 1995; 136(1): 22-31.
- [142] Klein WL, Krafft GA, Finch CE. *Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?* Trends Neurosci. 2001; 24(4): 219-24.
- [143] Klein WL, Stine WB Jr, Teplow DB. *Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging. 2004; 25(5): 569-80.
- [144] Catalano SM, Dodson EC, Henze DA, Joyce JG, Krafft GA, Kinney GG. *The role of amyloid-beta derived diffusible ligands (ADDLs) in Alzheimer's disease.* Curr Top Med Chem. 2006; 6(6): 597-608.
- [145] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(11): 6448-53.
- [146] Finder VH, Glockshuber R. *Amyloid-beta aggregation.* Neurodegener Dis. 2007; 4(1): 13-27.
- [147] Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, Jones BW, Fernandez SJ, Lacor PN, Horowitz P, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. *Self-assembly of Abeta(1-42) into globular neurotoxins.* Biochemistry. 2003; 42(44): 12749-60.
- [148] Taylor BM, Sarver RW, Fici G, Poorman RA, Lutzke BS, Molinari A, Kawabe T, Kappenman K, Buhl AE, Epps DE. *Spontaneous aggregation and cytotoxicity of the beta-amyloid Abeta1-40: a kinetic model.* J Protein Chem. 2003; 22(1): 31-40.
- [149] Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT. *Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy.* Chem Biol. 1997; 4(2): 119-25.

- [150] Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB. *Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates.* J Biol Chem. 1999; 274(36): 25945-52.
- [151] Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. *Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers.* J Neurosci. 2004; 24(45): 10191-200.
- [152] Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ. *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons.* J Neurosci. 1999; 19(20): 8876-84.
- [153] Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. *Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(18): 10417-22.
- [154] Hardy J, Selkoe DJ. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science. 2002; 297(5580): 353-6.
- [155] Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W. *The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease.* Neurobiol Dis. 1996; 3(3): 159-68.
- [156] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.* Nature. 1991; 349(6311): 704-6.
- [157] Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, Frébourg T, Checler F. *Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(7): 4119-24.
- [158] Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ. *Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(25): 11993-7.
- [159] Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.* Nature. 1995; 375(6534): 754-60.
- [160] Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. *A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1.* Science. 1995; 269(5226): 970-3.
- [161] Haass C. *Presenilins: genes for life and death.* Neuron. 1997; 18(5): 687-90.
- [162] Selkoe DJ. *Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(20): 11039-41.
- [163] Pangalos MN, Jacobsen SJ, Reinhart PH. *Disease modifying strategies for the treatment of Alzheimer's disease targeted at modulating levels of the beta-amyloid peptide.* Biochem Soc Trans. 2005; 33: 553-8.
- [164] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. *Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.* Science. 1996; 274(5284): 99-102.
- [165] Strittmatter WJ, Roses AD. *Apolipoprotein E and Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(11): 4725-7.
- [166] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.* Science. 1993; 261(5123): 921-3.

- [167] Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. *Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition*. Nat Genet. 1997; 17(3): 263-4.
- [168] LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE. *Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid*. J Biol Chem. 1994; 269(38): 23403-6.
- [169] Näslund J, Thyberg J, Tjernberg LO, Wernstedt C, Karlström AR, Bogdanovic N, Gandy SE, Lannfelt L, Terenius L, Nordstedt C. *Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain*. Neuron. 1995; 15(1): 219-28.
- [170] Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. *APP processing and synaptic function*. Neuron. 2003; 37(6): 925-37.
- [171] Selkoe DJ. *The molecular pathology of Alzheimer's disease*. Neuron. 1991; 6(4): 487-98.
- [172] Selkoe DJ. *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease*. Nature. 1999; 399(6738 Suppl): A23-31.
- [173] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. Nature. 2002; 416(6880): 535-9.
- [174] Kruman II, Mattson MP. *Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis*. J Neurochem. 1999; 72(2): 529-40.
- [175] Mark RJ, Blanc EM, Mattson MP. *Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol. 1996; 12(3): 211-24.
- [176] Markesbery WR. *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med. 1997; 23(1): 134-47.
- [177] Cotman CW. *Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 1998; 19(1 Suppl): S29-32.
- [178] Terry RD. *The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis*. J Neuropathol Exp Neurol. 1996; 55(10): 1023-5.
- [179] McGeer PL, McGeer EG. *The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases*. Brain Res Brain Res Rev. 1995; 21(2): 195-218.
- [180] Gitter BD, Cox LM, Rydel RE, May PC. *Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(23): 10738-41.
- [181] Meda L, Bonaiuto C, Szendrei GI, Ceska M, Rossi F, Cassatella MA. *beta-Amyloid(25-35) induces the production of interleukin-8 from human monocytes*. J Neuroimmunol. 1995; 59(1-2): 29-33.
- [182] Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. *Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma*. Nature. 1995; 374(6523): 647-50.
- [183] Birks J. *Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. Cochrane Database Syst Rev. 2006; (1): CD005593.
- [184] McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. *Memantine for dementia*. Cochrane Database Syst Rev. 2006; (2): CD003154.
- [185] Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, Haass C. *A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish*. EMBO Rep. 2002; 3(7): 688-94.
- [186] Citron M. *Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge*. Trends Pharmacol Sci. 2004; 25(2): 92-7.

- [187] Siemers ER, Quinn JF, Kaye J, Farlow MR, Porsteinsson A, Tariot P, Zoulnouni P, Galvin JE, Holtzman DM, Knopman DS, Satterwhite J, Gonzales C, Dean RA, May PC. *Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease*. Neurology. 2006; 66(4): 602-4.
- [188] Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ, Zhang L, Higgins GA, Parker EM. *Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation*. J Biol Chem. 2004; 279(13): 12876-82.
- [189] Higuchi M, Iwata N, Saido TC. *Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions*. Biochim Biophys Acta. 2005; 1751(1): 60-7.
- [190] Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, Ozols VV, Jessing KW, Zavitz KH, Koo EH, Golde TE. *NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo*. J Clin Invest. 2003; 112(3): 440-9.
- [191] Lleó A, Berezovska O, Herl L, Raju S, Deng A, Bacskai BJ, Frosch MP, Irizarry M, Hyman BT. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation*. Nat Med. 2004; 10(10): 1065-6.
- [192] Necula M, Kaye R, Milton S, Glabe CG. *Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct*. J Biol Chem. 2007; 282(14): 10311-24.
- [193] Walsh DM, Townsend M, Podlisny MB, Shankar GM, Fadeeva JV, El Agnaf O, Hartley DM, Selkoe DJ. *Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation*. J Neurosci. 2005; 25(10): 2455-62.
- [194] Citron M. *Strategies for disease modification in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci. 2004; 5(9): 677-85.
- [195] Weiner HL, Frenkel D. *Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease*. Nat Rev Immunol. 2006; 6(5): 404-16.
- [196] Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. *Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease*. Nat Med. 2000; 6(8): 916-9.
- [197] Schenk D. *Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning*. Nat Rev Neurosci. 2002; 3(10): 824-8.
- [198] Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jäckel S, Wei X, Buerger K, Höft C, Hemmer B, Möller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N, Du Y. *Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease*. Ann Neurol. 2002; 52(2): 253-6.
- [199] Solomon B. *Immunological approaches as therapy for Alzheimer's disease*. Expert Opin Biol Ther. 2002; 2(8): 907-17.
- [200] Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. *Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report*. Nat Med. 2003; 9(4): 448-52.
- [201] Internationale Diabetes-Föderation, Pressemitteilung. *Diabetes weltweit auf dem Vormarsch*. Erhältlich im Internet unter: <http://www.diabetes-deutschland.de/4911.htm> [Juni 2006]
- [202] Zündorf I, Dingermann T. *Vom Rinder-, Schweine-, Pferde-Insulin zum Humaninsulin: Die biotechnische und gentechnische Insulin-Herstellung*. Pharmazie in unserer Zeit. 2001; 1: 27-32.
- [203] Liebl A, Martin E. *Diabetes mellitus Typ 2*. Govi-Verlag, Eschborn. 2005.

- [204] Dingermann T, Hänsel R, Zündorf I. *Pharmazeutische Biologie*. Springer-Verlag. 2002.
- [205] Brange, J., Skelbaek-Pedersen, B., Langkjaer, L., Damgaard, U., Ege, H., Havelund, S., Heding, L. G., Jorgensen, K. H., Lykkeberg, J., Markussen, J., Pingel, M. & Rasmussen, E. *Galenics of insulin. The physicochemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations*. Springer-Verlag, Berlin. 1987.
- [206] Davidson MB. *Insulin aggregation and the use of infusion pumps*. Diabetologia. 1982; 22(6): 494-5.
- [207] Westermark P, Wilander E. *Islet amyloid in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes is related to insulin*. Diabetologia. 1983; 24(5): 342-6.
- [208] Dische FE, Wernstedt C, Westermark GT, Westermark P, Pepys MB, Rennie JA, Gilbey SG, Watkins PJ. *Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient*. Diabetologia. 1988; 31(3): 158-61.
- [209] Swift B. *Examination of insulin injection sites: an unexpected finding of localized amyloidosis*. Diabet Med. 2002; 19(10): 881-2.
- [210] Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. *Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation*. Pharm Res. 2003; 20(9): 1325-36.
- [211] Owens J. *Self-regulating insulin bioreactors for diabetes*. Drug Discov Today. 2002; 7(1): 8-9.
- [212] Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink AL. *Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants*. Biochemistry. 2001; 40(28): 8397-409.
- [213] Adams, M. J. et al. *Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals*. Nature. 1969; 224: 491-494.
- [214] Zoete V, Meuwly M, Karplus M. *A comparison of the dynamic behavior of monomeric and dimeric insulin shows structural rearrangements in the active monomer*. J Mol Biol. 2004; 342(3): 913-29.
- [215] Whittingham JL, Scott DJ, Chance K, Wilson A, Finch J, Brange J, Guy Dodson G. *Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation*. J Mol Biol. 2002; 318(2): 479-90.
- [216] Brange J, Dodson GG, Edwards DJ, Holden PH, Whittingham JL. *A model of insulin fibrils derived from the x-ray crystal structure of a monomeric insulin (despentapeptide insulin)*. Proteins. 1997; 27(4): 507-16.
- [217] Ahmad A, Millett IS, Doniach S, Uversky VN, Fink AL. *Partially folded intermediates in insulin fibrillation*. Biochemistry. 2003; 42(39): 11404-16.
- [218] Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink AL. *Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism*. Biochemistry. 2001; 40(20): 6036-46.
- [219] Jiménez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson CV, Dobson CM, Saibil HR. *The protofilament structure of insulin amyloid fibrils*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(14): 9196-201.
- [220] Hua QX, Weiss MA. *Mechanism of insulin fibrillation: the structure of insulin under amyloidogenic conditions resembles a protein-folding intermediate*. J Biol Chem. 2004; 279(20): 21449-60.
- [221] Brange J, Andersen L, Laursen ED, Meyn G, Rasmussen E. *Toward understanding insulin fibrillation*. J Pharm Sci. 1997; 86(5): 517-25.
- [222] Burke MJ, Rougvie MA. *Cross- protein structures. I. Insulin fibrils*. Biochemistry. 1972; 11(13): 2435-9.

- [223] Bouchard M, Zurdo J, Nettleton EJ, Dobson CM, Robinson CV. *Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy*. Protein Sci. 2000; 9(10): 1960-7.
- [224] Merrifield RB. *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. J Am Chem Soc. 1963; 85: 2149-54
- [225] Rink H. *Solid phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin*. Tetrahedron Lett. 1987; 28: 3787-90.
- [226] Wang S-S. *p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments*. J Am Chem Soc. 1973; 95(4): 1328-33
- [227] Greene LA, Tischler AS. *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976; 73(7): 2424-8.
- [228] Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, Lauris V. *Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77(6): 3519-23.
- [229] Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*. In Vitro. 1978; 14(11): 911-5.
- [230] Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Immunol Methods. 1983; 65(1-2): 55-63.
- [231] Vassar PS, Culling CF. *Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues*. Arch Pathol. 1959; 68: 487-98.
- [232] Krebs MR, Bromley EH, Donald AM. *The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications*. Struct Biol. 2005; 149(1): 30-7.
- [233] LeVine III H. *Thioflavine T Interaction with Synthetic Alzheimer's Disease - Amyloid Peptides: Detection of Amyloid Aggregation in Solution*. Protein Science. 1993; 2: 404-10
- [234] Gill SC, von Hippel PH. *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem. 1989; 182(2): 319-26.
- [235] Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci. 1995; 4(11): 2411-23.
- [236] Galla H-J. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme Verlag. 1988
- [237] Eftink MR. *Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions*. Methods Enzymol. 1997; 278: 221-57.
- [238] Dursina B, Thomä NH, Sidorovitch V, Niculae A, Iakovenko A, Rak A, Albert S, Ceacareanu AC, Kölling R, Herrmann C, Goody RS, Alexandrov K. *Interaction of yeast Rab geranylgeranyl transferase with its protein and lipid substrates*. Biochemistry. 2002; 41(21): 6805-16.
- [239] Kakio A, Nishimoto SI, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. *Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid*. J Biol Chem. 2001; 276(27): 24985-90.
- [240] Greenfield N, Fasman GD. *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*. Biochemistry. 1969; 8(10): 4108-16.
- [241] Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.
- [242] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem. 1985; 150(1): 76-85.
- [243] Chenais F, Virella G, Patrick CC, Fudenberg HH. *Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate*. J Immunol Methods. 1977; 18(1-2): 183-92.

- [244] Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV. *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem Biophys Res Commun. 1967; 28(5): 815-20.
- [245] Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 1970; 227(5259): 680-5.
- [246] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76(9): 4350-4.
- [247] Poehling HM, Neuhoff V. *Visualization of proteins with a silver "stain": A critical. analysis*. Electrophoresis. 1981; 2: 141-7
- [248] Heukeshoven J, Dernick R. *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining*. Electrophoresis. 1985; 6: 103-112
- [249] Bucciantini M, Calloni G, Chiti F, Formigli L, Nosi D, Dobson CM, Stefani M. *Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity*. J Biol Chem. 2004; 279(30): 31374-82.
- [250] Larson JL, Miranker AD. *The mechanism of insulin action on islet amyloid polypeptide fiber formation*. J Mol Biol. 2004; 335(1): 221-31.
- [251] Jaikaran ET, Nilsson MR, Clark A. *Pancreatic beta-cell granule peptides form heteromolecular complexes which inhibit islet amyloid polypeptide fibril formation*. Biochem J. 2004; 377(Pt 3): 709-16.
- [252] Gilead S, Wolfenson H, Gazit E. *Molecular mapping of the recognition interface between the islet amyloid polypeptide and insulin*. Angew Chem Int Ed Engl. 2006; 45(39): 6476-80.
- [253] Shearman MS, Hawtin SR, Tailor VJ. *The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides*. J Neurochem. 1995; 65(1): 218-27.
- [254] Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL. *Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(4): 1470-4.
- [255] Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. *Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(17): 7951-5.
- [256] Gschwind M, Huber G. *Apoptotic cell death induced by beta-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent*. J Neurochem. 1995; 65(1): 292-300.
- [257] Klein AM, Kowall NW, Ferrante RJ. *Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex*. Ann N Y Acad Sci. 1999; 893: 314-20.
- [258] Jansen R, Dzwolak W, Winter R. *Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy*. Biophys J. 2005; 88(2): 1344-53.
- [259] Sepp-Lorenzino L, Rosen N, Lebowitz DE. *Insulin and insulin-like growth factor signaling are defective in the MDA MB-468 human breast cancer cell line*. Cell Growth Differ. 1994; 5(10): 1077-83.
- [260] Simpson L, Li J, Liaw D, Hennessy I, Oliner J, Christians F, Parsons R. *PTEN expression causes feedback upregulation of insulin receptor substrate 2*. Mol Cell Biol. 2001; 21(12): 3947-58.
- [261] Jaikaran ET, Higham CE, Serpell LC, Zurdo J, Gross M, Clark A, Fraser PE. *Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis*. J Mol Biol. 2001; 308(3): 515-25.
- [262] Nilsson MR, Raleigh DP. *Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin*. J Mol Biol. 1999; 294(5): 1375-85.

- [263] Kajava AV, Aebi U, Steven AC. *The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin*. J Mol Biol. 2005; 348(2): 247-52.
- [264] Nicolls MR. *The clinical and biological relationship between Type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res. 2004; 1(1): 47-54.
- [265] Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. *Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease*. Diabetes. 2004; 53(2): 474-81.
- [266] Uversky VN, Fink AL. *Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded*. Biochim Biophys Acta. 2004; 1698(2): 131-53.
- [267] O'Nuallain B, Williams AD, Westermark P, Wetzel R. *Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils*. J Biol Chem. 2004; 279(17): 17490-9.
- [268] Williams AD, Portelius E, Kheterpal I, Guo JT, Cook KD, Xu Y, Wetzel R. *Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis*. J Mol Biol. 2004; 335(3): 833-42.
- [269] Yan LM, Velkova A, Tatarek-Nossol M, Andreetto E, Kapurniotu A. *IAPP mimic blocks Abeta cytotoxic self-assembly: cross-suppression of amyloid toxicity of Abeta and IAPP suggests a molecular link between Alzheimer's disease and type II diabetes*. Angew Chem Int Ed Engl. 2007; 46(8): 1246-52.
- [270] Cohen FE, Kelly JW. *Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases*. Nature. 2003; 426(6968): 905-9.
- [271] Gazit E. *Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. Model short peptides as a key research tool*. FEBS J. 2005; 272(23): 5971-8.
- [272] Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. *An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88(16): 7247-51.
- [273] Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory*. Nature. 2006; 440(7082): 352-7.
- [274] Walsh G. *Therapeutic insulins and their large-scale manufacture*. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 67(2): 151-9.
- [275] Chiti F, Dobson CM. *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. Annu Rev Biochem. 2006; 75: 333-66.
- [276] Stefani M, Dobson CM. *Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution*. J Mol Med. 2003; 81(11): 678-99.
- [277] Hull RL, Westermark GT, Westermark P, Kahn SE. *Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(8): 3629-43.
- [278] Velkova A, Tatarek-Nossol M, Andreetto E, Kapurniotu A. *Exploiting cross-amyloid interactions to inhibit protein aggregation but not function: nanomolar affinity inhibition of insulin aggregation by an IAPP mimic*. Angew Chem Int Ed Engl. 2008; 47(37): 7114-8.
- [279] Carulla N, Caddy GL, Hall DR, Zurdo J, Gairí M, Feliz M, Giralte E, Robinson CV, Dobson CM. *Molecular recycling within amyloid fibrils*. Nature. 2005; 436(7050): 554-8.
- [280] Ottensmeyer FP, Beniac DR, Luo RZ, Yip CC. *Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor*. Biochemistry. 2000; 39(40): 12103-12.
- [281] Cheatham B, Kahn CR. *Insulin action and the insulin signaling network*. Endocr Rev. 1995; 16(2): 117-42.
- [282] Nystrom FH, Quon MJ. *Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity*. Cell Signal. 1999; 11(8): 563-74.
- [283] Schmitz O, Brock B, Rungby J. *Amylin agonists: a novel approach in the treatment of diabetes*. Diabetes. 2004; 53 Suppl 3: S233-8.

- [284] Jones MC. *Therapies for diabetes: pramlintide and exenatide*. Am Fam Physician. 2007; 75(12): 1831-5.
- [285] Sun MK, Alkon DL. *Links between Alzheimer's disease and diabetes*. Drugs Today. 2006; 42(7): 481-9.
- [286] Banks WA, Kastin AJ, Maness LM, Huang W, Jaspan JB. *Permeability of the blood-brain barrier to amylin*. Life Sci. 1995; 57(22): 1993-2001.
- [287] Brange J, Langkjoer L. *Insulin structure and stability*. Pharm Biotechnol. 1993; 5: 315-50.
- [288] Grudzielanek S, Velkova A, Shukla A, Smirnovas V, Tatarek-Nossol M, Rehage H, Kapurniotu A, Winter R. *Cytotoxicity of insulin within its self-assembly and amyloidogenic pathways*. J Mol Biol. 2007; 370(2): 372-84.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau Univ.-Prof. Dr. Aphrodite Kapurniotu (inzwischen Technische Universität München) in der Abteilung Biochemie und Molekulare Zellbiologie (Institut für Biochemie) des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchgeführt.

Frau Prof. Aphrodite Kapurniotu danke ich für die Bereitstellung des Themas, für ihre stete unermüdliche und sehr gute Betreuung meiner Arbeit, die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowie die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Durch ihr großes Interesse am Fortschreiten meiner Arbeit und ihre stetige Diskussionsbereitschaft trug sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen Bernhagen für die vielen Anregungen, wissenschaftlichen Diskussionen und seiner Hilfe bei der Etablierung des Insulinrezeptor-Assays.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Werner Baumgartner danke ich sehr für die Begutachtung der Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Weiterhin möchte ich mich beim Herrn Univ.-Prof. Dr. Markus Albrecht für die Teilnahme als Berichterstatter der Prüfungskommission bedanken.

Für die wertvollen Tipps bezüglich der Kultivierung von PC-12 Zellen danke ich Herrn Priv.Do. Dr. Alexander Krüttgen.

Bei Univ.-Prof. Dr. Stefan Stevanović und Dr. Rainer Fischer (Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen), Dr. Daniel Bächle und Dr. Hubert Kalbacher (PANATecs GmbH, Tübingen) möchte ich mich sehr für die massenspektroskopischen Analysen bedanken.

Dr. Kirill Alexandrov und Univ.-Prof. Dr. Roger S. Goody danke ich für ihre Hilfe bei der Analyse der Fluoreszenzdaten.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die vielen ermutigenden Gespräche, sowie die tatkräftige Unterstützung im Labor, bedanke ich mich herzlich bei meinen netten Kolleginnen Marianna Tatarek-Nossol, Li-Mei Yan und Erika Andreetto. Ein großes Dankeschön möchte ich auch für die unzähligen Zellkulturarbeiten, HPLC-Aufreinigungen, Oligomerisierungs- und Apoptose-Assays aussprechen, die von Marianna Tatarek-Nossol durchgeführt wurden. Danke an Li-Mei Yan für die A β -Thioflavin-T Assays, die Vorarbeiten bezüglich der Insulin-Fibrillenbildung und für die vielen Peptidaufreinigungen. Erika Andreetto möchte ich für die

zahlreichen Synthesen, Peptidmarkierungen und -aufreinigungen, sowie für ihre Freundschaft und Unterstützung, auch außerhalb des Labors, sehr danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Bernhagen und Lüscher danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt:

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, immer zu mir standen und mich in allen Lebenslagen geduldig unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Aleksandra Velkova
Geburtsdatum: 29. August 1978
Geburtsort: Nürtingen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 – 1986	Besuch der Grundschule in Strumiza (Makedonien)
1986 – 1988	Besuch der Grundschule in Nürtingen
1988 – 1990	Besuch der Mörike-Schule (Hauptschule) in Nürtingen
1990 – 1995	Besuch der Neckarrealschule in Nürtingen
1995 – 1998	Abitur – ernährungswissenschaftliche Richtung – an der Fritz-Ruoff-Schule in Nürtingen

Hochschulausbildung:

10/1998 – 03/2003	Biotechnologie-Studium an der Fachhochschule für Technik und Gestaltung Mannheim Abschluss: Diplom-Ingenieurin (FH)
07/2003 – 12/2003	Diplomarbeit bei EMC microcollections GmbH, Tübingen

Berufstätigkeit:

06/2004	wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Instituts für Biochemie am Universitätsklinikums der RWTH Aachen
---------	---