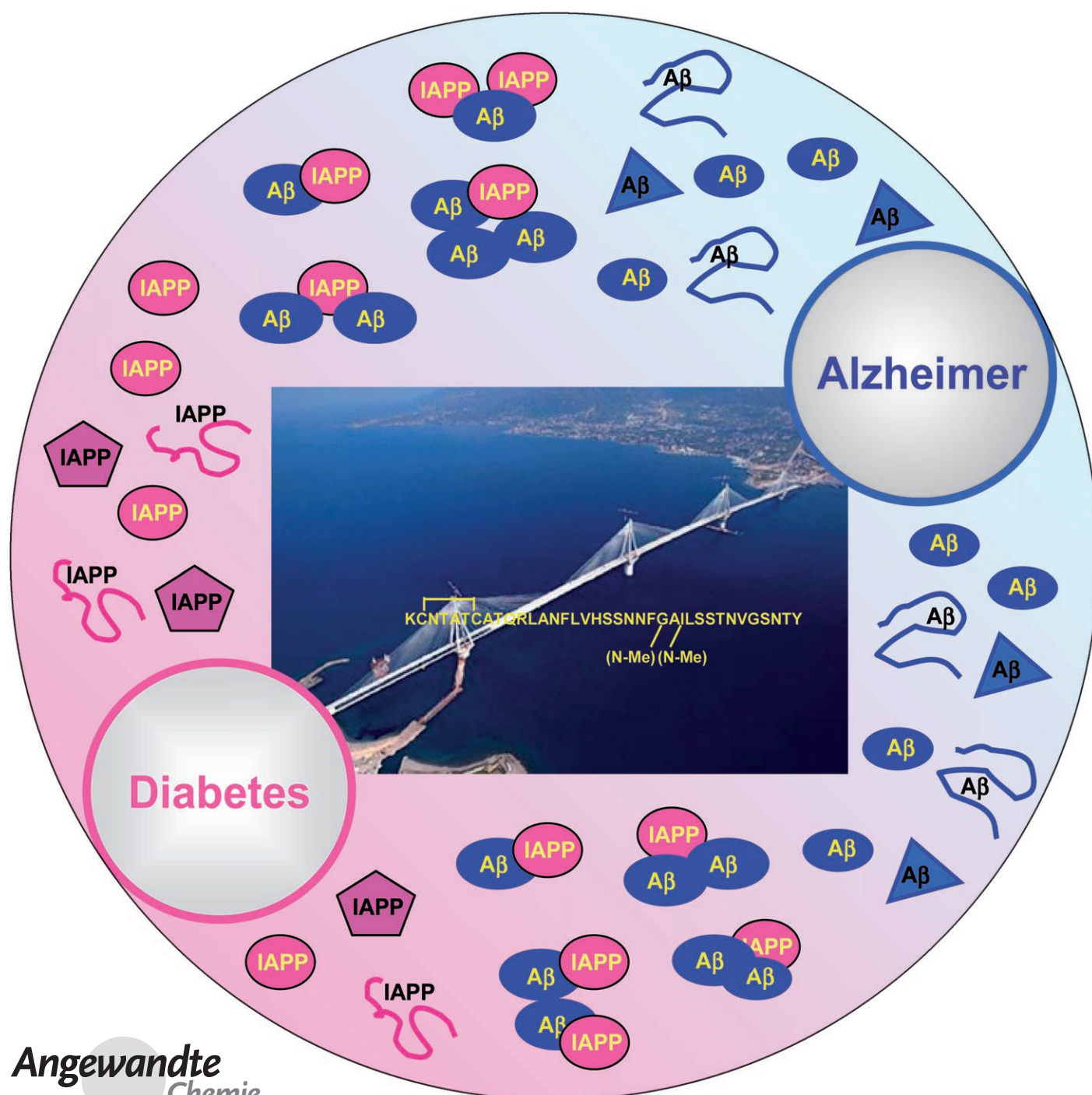


Ein IAPP-Mimetikum blockiert die zytotoxische Aggregation von A β – die Kreuzunterdrückung der Amyloidtoxizität von A β und IAPP deutet auf einen molekularen Zusammenhang zwischen Alzheimer-Krankheit und Typ-II-Diabetes hin**

*Li-Mei Yan, Aleksandra Velkova, Marianna Tatarek-Nossol, Erika Andreetto und Aphrodite Kapurniotu**



Die Fehlfaltung und Selbstassoziation von zunächst nichttoxischen Proteinen und Polypeptiden in zytotoxische Oligomere und Amyloidfibrillen steht in engem Zusammenhang mit einer Reihe von schwerwiegenden zelldegenerativen Krankheiten.^[1–3] Diese Krankheiten, zu denen die Alzheimer-Krankheit (AD) und der Typ-II-Diabetes (T2D) zählen, werden häufig auch als Proteinaggregationskrankheiten bezeichnet.^[1–3] Neuere Befunde deuten darauf hin, dass AD und T2D zusammenhängen könnten.^[4,5] So weisen klinische Studien darauf hin, dass T2D-Diabetiker ein größeres Risiko haben, an AD zu erkranken, und umgekehrt.^[4,5] Auf der pathophysiologischen Ebene bewirken beide Krankheiten eine lokale extrazelluläre Anhäufung von Amyloidfibrillen und eine progressive Zelldegeneration.^[1] Gewisse Ähnlichkeiten scheinen auch auf molekularer Ebene zu bestehen. Die Hauptkomponente des Amyloids im AD-Gehirn ist das β -Amyloidpeptid ($A\beta$), ein aus 40 ($A\beta_{40}$) bis 42 ($A\beta_{42}$) Aminosäureresten bestehendes Polypeptid mit bisher unbekannter Funktion (Abbildung 1).^[6] Die pankreatischen Amyloidplaques beim T2D bestehen aus dem Inselamyloid-Polypeptid (islet amyloid polypeptide, IAPP), einem Polypeptid mit 37 Aminosäureresten, das physiologisch als neuroendokriner Regulator des Kohlenhydratstoffwechsels wirkt (Abbildung 1).^[1] Bei den amyloidogenen Schlüsselmolekülen von AD und T2D handelt es sich somit um zwei kurze, lineare und konformativ flexible oder „inhärent entfaltete“ Polypeptide,

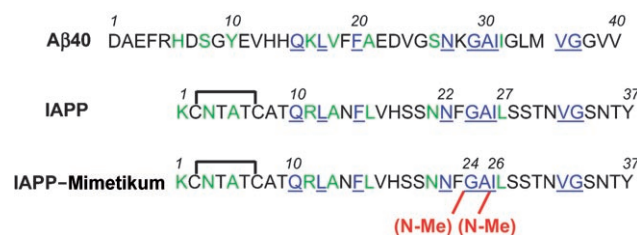


Abbildung 1. Primärstrukturen von $A\beta_{40}$, IAPP und dem IAPP-Mimetikum IAPP-GI.^[13] Gleiche Reste in den Sequenzen sind blau und unterstrichen dargestellt, ähnliche Reste sind in Grün gehalten.^[9]

[*] Dipl.-Chem. L.-M. Yan, Dipl.-Ing. A. Velkova,
Dipl.-Chem. M. Tatarek-Nossol, Dipl.-Chem. E. Andreotto,
Prof. Dr. A. Kapurniotu
Labor für Bioorganische und Medizinische Chemie
Institut für Biochemie
Universitätsklinikum der RWTH Aachen
Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen (Deutschland)
Fax: (+49) 241-808-2427
E-Mail: akapurniotu@ukaachen.de
Homepage: <http://www.ukaachen.de/content/person/4605521>

[**] Wir sind J. Bernhagen für hilfreiche Diskussionen und seine wertvolle Hilfe bei der Übersetzung des Manuskripts dankbar. Wir bedanken uns bei K. Alexandrov und R. S. Goody für ihre Hilfe bei der Analyse von Fluoreszenzdaten. Wir danken A. Kazantzis, K. Tenidis, M. Waldner, H. Vasen und M. Müsken für Peptidsynthesen und D. Bächle, PANATecs GmbH, R. Fischer, H. Kalbacher für MALDI-Messungen. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

die dennoch stark zur Aggregation neigen.^[7,8] Beide Polypeptide aggregieren schon in nanomolaren Konzentrationen. Interessanterweise sind die Sequenzen von $A\beta_{40}$ und IAPP zu 25 % identisch und zu 50 % ähnlich, wobei die höchste Identität und Ähnlichkeit innerhalb der kurzen Sequenzen $A\beta_{(15–21)}$ und IAPP(10–16) oder $A\beta_{(26–32)}$ und IAPP(21–27) beobachtet wird, die an der Selbstassoziation von $A\beta_{40}$ und IAPP beteiligt sein sollen (Abbildung 1).^[9–12] Darüber hinaus wurde kürzlich berichtet, dass $A\beta_{40}$ -Amyloidfibrillen als Nucleationskeime der IAPP-Amyloidbildung fungieren können.^[9] Demnach könnte es bestimmte $A\beta_{40}$ - und IAPP-Strukturen geben, die miteinander wechselwirken. Bisher wurde jedoch noch kein direkter Nachweis einer solchen Wechselwirkung geführt.

Wir haben vor kurzem ein konformativ eingeschränktes IAPP-Analogon entworfen, das eine nicht amyloidogene und nichttoxische IAPP-Konformation nachahmen sollte.^[13] Das IAPP-Mimetikum [(N-Me)G24, (N-Me)I26]-IAPP (IAPP-GI) wurde durch die N-Methylierung von zwei Amidbindungen auf der gleichen Seite des β -Stranges der Amyloid-Kernsequenz IAPP(22–27), NFGAIL, der IAPP-Sequenz erhalten (Abbildung 1). Diese N-Methylierungsstrategie lässt die intermolekulare Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Amidbindungen unterschiedlicher β -Stränge nur über eine „Seite“ der N-methylierten Sequenz zu. Intermolekulare Wasserstoffbrücken sind für die β -Faltblatt-vermittelte Selbst- und Heteroassoziation notwendig.

Es stellte sich tatsächlich heraus, dass IAPP-GI ein sehr gut lösliches, nicht amyloidogenes und nichttoxisches IAPP-Analogon ist. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass IAPP-GI lösliche präfibrilläre IAPP-Spezies mit einer Affinität im unteren nanomolaren Bereich bindet, und dass es in der Lage ist, die zytotoxische IAPP-Selbstassoziation und -Amyloidbildung zu blockieren und sogar umzukehren.^[13]

Hier zeigen wir, dass IAPP-GI auch präfibrilläre $A\beta_{40}$ -Spezies binden und die zytotoxische Selbstassoziation von $A\beta_{40}$ blockieren und umkehren kann. Darüber hinaus berichten wir, dass auch „frühe“ präfibrilläre IAPP-Spezies $A\beta_{40}$ binden können, und dass die $A\beta_{40}$ /IAPP-Heteroassoziation die zytotoxische Selbstassoziation von $A\beta_{40}$ und IAPP unterdrücken kann.

Zunächst haben wir anhand der Rattenphäochromozytom-Zelllinie PC-12 untersucht, ob IAPP-GI die Bildung zytotoxischer $A\beta_{40}$ -Aggregate verhindern kann.^[14] Gealterte $A\beta_{40}$ -Lösungen oder Mischungen von $A\beta_{40}$ mit IAPP-GI (1:1) wurden zu den Zellen gegeben (Abbildung 2 a). Die Zellvitalitäten wurden durch einen 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Reduktionsassay und durch Bestimmung des apoptotischen Zelltods ermittelt.^[14,15] IAPP-GI blockierte die Zytotoxizität von $A\beta_{40}$ vollständig über einen großen Konzentrationsbereich (Faktor 100; Abbildung 2 a,b). Interessanterweise hatte Ratten-IAPP (rIAPP), ein natürliches nicht amyloidogenes IAPP-Analog, keine signifikante Wirkung auf die Zytotoxizität von $A\beta_{40}$ (Abbildung 2 a). Dieser Befund wies darauf hin, dass dem inhibitorischen Effekt von IAPP-GI eine spezifische Wechselwirkung zugrunde liegen muss. Titrationen zytotoxischer $A\beta_{40}$ -Spezies mit IAPP-GI ergaben einen IC_{50} -Wert von 78 nM (Abbildung 2 c). Somit wurde klar, dass IAPP-GI ein

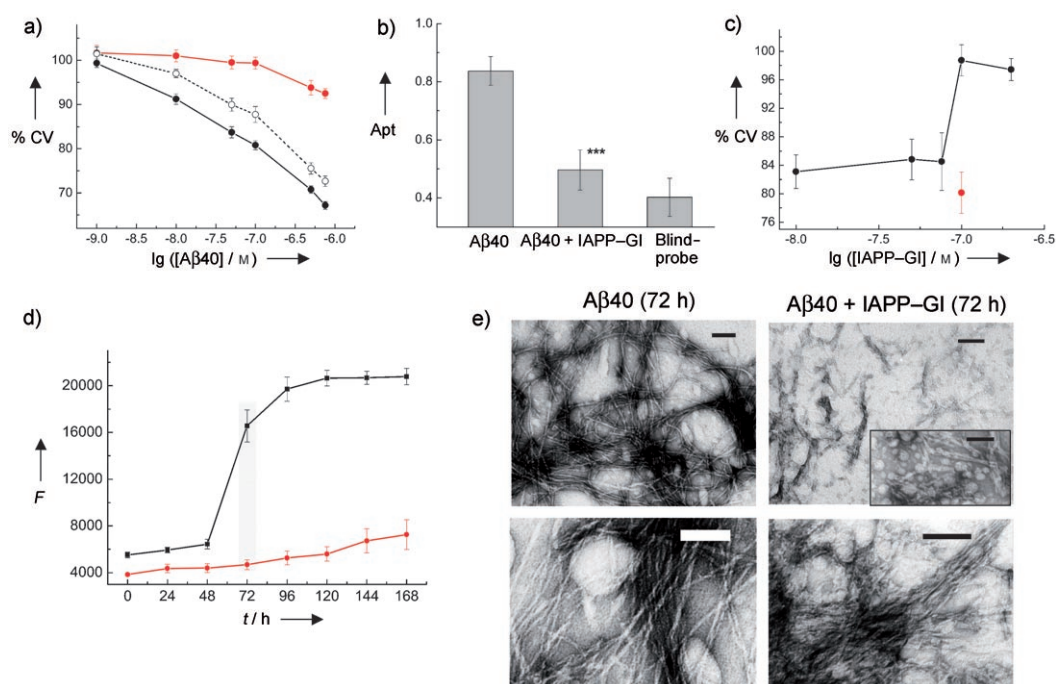


Abbildung 2. Inhibition der zytotoxischen Selbstassoziation und Fibrillognese von A β 40 durch IAPP-GI. a) Wirkung von A β 40 (schwarze Kreise) gegen eine 1:1-Mischung von A β 40 mit IAPP-GI (rote Kreise) oder mit rIAPP (leere Kreise) auf die Vitalität von PC-12 Zellen (% CV) (% der Blindprobe), gemessen durch MTT-Reduktion. Die Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus 3–6 Assays (je $n=3$). b) Inhibition der durch A β 40 (1 μ M) induzierten Apoptose (Apt) auf PC-12 durch IAPP-GI (1:1). (***, $P<0.001$ mit ANOVA.) Die Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) von 3 Assays (je $n=3$). c) MTT-Assay: Bestimmung der IC_{50} der Inhibition von IAPP-GI auf die Zytotoxizität von A β 40 auf PC-12-Zellen durch Titration von A β 40 (100 nM) mit verschiedenen Mengen an IAPP-GI (A β 40 allein: roter Kreis; Mischungen: schwarze Kreise). Die Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) von 3 Assays (je $n=3$). d) ThT-Bindungsassay der Fibrillognese von A β 40 (16.5 μ M; schwarze Kreise) gegen eine 1:1-Mischung von A β 40 und IAPP-GI (rote Kreise). F: ThT-Fluoreszenz. Der graue Balken zeigt den Zeitpunkt der TEM-Untersuchung. e) TEM-Bilder der Fibrillenbildung von A β 40 (links) und einer Mischung von A β 40 und IAPP-GI (1:1; rechts). Aliquote der Inkubationen (Abbildung 2 d) wurden nach 72 h durch TEM untersucht (Maßstab je 100 nm). Im Einschub sind runde Oligomere gezeigt.

effizienter Inhibitor der A β 40-Zytotoxizität mit einer Aktivität im unteren nanomolaren Bereich ist.

Als nächstes untersuchten wir, ob IAPP-GI mit der Amyloidogenese von A β 40 interferieren könnte. Für diese Studien wurden ein amyloidspezifischer Thioflavin-T (ThT)-Bindungsassay und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) angewendet.^[16] Die Amyloidbildung von A β 40 setzte nach ungefähr 48 h ein und war nach 72–96 h abgeschlossen (Abbildung 2 d,e). In Gegenwart einer äquimolaren Menge von IAPP-GI war sie jedoch komplett blockiert (Abbildung 2 d,e). Die A β 40/IAPP-GI-Mischungen bestanden hauptsächlich aus runden Oligomeren mit Durchmessern zwischen 20 und 50 nm sowie aus nichtfibrillären Aggregaten runder Oligomere (Abbildung 2 e).

Die Fähigkeit des IAPP-GI-Moleküls, präfibrilläre A β 40-Spezies zu binden, wurde mithilfe von Fern-UV-CD-Spektroskopie, Pull-down-Assays und Fluoreszenzspektroskopie bestätigt. Das CD-Spektrum einer Mischung aus frisch gelöstem A β 40 mit IAPP-GI (1:1) unterschied sich deutlich von der mathematischen Summe der Spektren der einzelnen Komponenten, sodass IAPP-GI mit A β 40 wechselwirken sollte (Abbildung 3 a). Außerdem deutete das Spektrum der Mischung auf die Bildung geordneter Heterokomplexe hin. N^α-aminoterminal biotinyliertes IAPP-GI (Biotin-IAPP-GI) wurde in der Folge mit frisch gelöstem A β 40 (1:1 oder 1:2)

inkubiert, und Biotin-IAPP-GI-A β -Komplexe wurden über ihre spezifische Bindung an Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen isoliert. Nach Ablösen der Komplexe von den Kügelchen wurden eine NuPAGE-Elektrophorese und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Mit dieser Analyseverfahren ließen sich signifikante Mengen an A β 40-Monomeren und -Dimeren in der Mischung nachweisen (Abbildung 3 b). So wurde eindeutig gezeigt, dass Biotin-IAPP-GI an A β 40 bindet.

Die Affinität der IAPP-GI/A β 40-Wechselwirkung wurde mithilfe von Fluoreszenzspektroskopie quantifiziert.^[13,17] Hierzu haben wir N^α-aminoterminal Fluorescein-markiertes IAPP-GI (Fluos-IAPP-GI) mit A β 40 titriert und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen.^[13] Dabei steigerte die Bindung eines 100fachen molaren Überschusses von A β 40 im Verhältnis zu Fluos-IAPP-GI die Fluoreszenz um etwa 50 % (Abbildung 3 c). Eine sigmoidale Bindungsisotherme konnte abgeleitet werden, aus der sich über eine Kurvenanpassung eine scheinbare Dissoziationskonstante (app. K_d) von (41.2 ± 3.9) nM ergab (Abbildung 3 d). Da nanomolare A β 40-Lösungen neben Monomeren aber auch niedermolekulare Oligomere enthalten können, ließ sich daraus schließen, dass IAPP-GI Monomere oder niedermolekulare Oligomere von A β 40 binden kann.^[18]

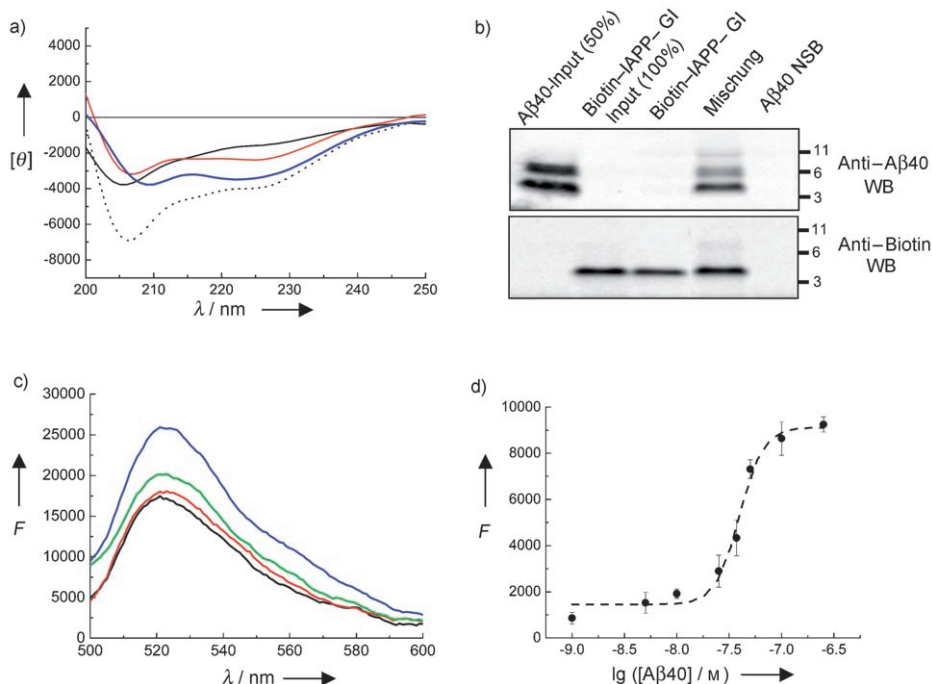


Abbildung 3. Bindung von IAPP-GI an A β 40: a) Fern-UV-CD-Spektren von A β 40 (5 μ M; schwarz), IAPP-GI (5 μ M; rot), einer Mischung von A β 40 und IAPP-GI (je 5 μ M; blau) und die Summe der Spektren von A β 40 und IAPP-GI (gepunktete Linie). $[\theta]$ ist die mittlere molare Elliptizität in $[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}]$. b) Biotin-pull-down-Assay: oben: Anti-A β 40-Western-Blot (WB) einer Mischung von A β 40 (5 μ M) mit Biotin-IAPP-GI (2.5 μ M) gegen A β 40 allein (5 μ M) nach Biotin-pull-down und Peptiddissoziation. A β 40-Input: Input (50%) (frisch gelöstes Peptid (4 μ g), nicht mit Kügelchen inkubiert); Biotin-IAPP-GI-Input: Input (100%, 4 μ g); Biotin-IAPP-GI: Biotin-IAPP-GI allein; Mischung: 1:2-Mischung von Biotin-IAPP-GI mit A β 40; A β 40 NSB: A β 40 allein (nichtspezifische Bindung (NSB) für Spur „Mischung“). Unten: Anti-Biotin-Western-Blot der gleichen Lösungen. Repräsentative Blots aus drei Experimenten werden gezeigt. c) Fluoreszenzemissionsspektren von Fluos-IAPP-GI allein (1 nM; schwarz) und nach Titration mit A β 40. Fluos-IAPP-GI und A β 40 im molaren Verhältnis 1:1 (rot), 1:25 (grün) und 1:100 (blau). d) Bindungskurve (gestrichelte Linie) von Fluos-IAPP-GI nach der Titration mit A β 40 (siehe (c)); Fluoreszenz bei 522 nm, die Fluoreszenz von Fluos-IAPP-GI allein wurde abgezogen. Die Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus drei Bindungskurven.)

Anschließend wurde untersucht, auf welcher Stufe des A β 40-Selbstassoziationsprozesses IAPP-GI eingreift. Es stellte sich heraus, dass IAPP-GI die Bildung zytotoxischer A β 40-Oligomere und Amyloidfibrillen blockierte, wenn es vor der Nucleation der Amyloidbildung zu A β 40 im Verhältnis 1:1 hinzugefügt wurde (Abbildung 4a,b). Wenn es nach dem Beginn des zytotoxischen Selbstassoziations- und Fibrillogeneseprozesses von A β 40 zugegeben wurde, blockierte IAPP-GI (1:1) die Fibrillogeneseprozess von A β 40 ebenfalls vollständig. Es bewirkte darüber hinaus ein Dissoziieren der zytotoxischen A β 40-Aggregate und hob somit die A β 40-Zytotoxizität auf (Abbildung 4a–c). Zudem führte die Zugabe von IAPP-GI (1:1) zu frühen präfibrillären und nichttoxischen A β 40-Spezies dazu, dass die Bildung von zytotoxischen Aggregaten und Fibrillen mindestens 7 Tage blockiert wurde. Daraus ließ sich schließen, dass IAPP-GI präfibrilläre nicht-toxische A β 40-Spezies bindet und ihre weitere Umwandlung in zytotoxische Oligomere und Fibrillen unterdrückt (Abbildung 4a,d).

Da IAPP-GI eine stabilisierte, nicht amyloidogene IAPP-Konformation repräsentiert, deuteten unsere Ergebnisse darauf hin, dass es mindestens eine nicht fibrilläre IAPP-Konformation geben könnte, welche die zytotoxische Selbstassoziation von A β 40 verhindert. Um diese Hypothese

zu testen, haben wir den kinetischen Verlauf der Bildung zytotoxischer Oligomere und Amyloidfibrillen aus frisch gelöstem A β 40, IAPP und Mischungen beider Peptide (1:1) untersucht. Der folgende ThT-Assay zeigte in der Tat, dass die Nucleation der Fibrillierung der A β 40/IAPP-Mischungen verzögert wird (um ca. 24 h für A β 40 und um ca. 72 h für IAPP; Abbildung 5a). Die Fibrillogeneseprozess der Mischungen war jedoch nach 7 Tagen vollständig abgeschlossen (Abbildung 5a). Diese Ergebnisse wurden mit TEM-Messungen bestätigt, die zeigten, dass nichtfibrilläre, runde Oligomere – möglicherweise Heterooligomere – Hauptspezies zu frühen Zeitpunkten waren (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Aliquote dieser Lösungen wurden nun zu PC-12-Zellen gegeben, und die Zellvitalitäten wurden gemessen (Abbildung 5b). Es stellte sich heraus, dass die Umwandlung von nichttoxischen präfibrillären Spezies in zytotoxische Spezies in den A β 40/IAPP-Mischungen im Vergleich zu Lösungen von A β 40 oder IAPP signifikant unterdrückt war (Abbildung 5b). Im Unterschied jedoch zu den A β 40/IAPP-GI-Mischungen wurden die A β 40/IAPP-Lösungen genauso toxisch wie 7 Tage lang gealtertes IAPP und A β 40 allein. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass die Wechselwirkung zwischen frühen präfibrillären und nichttoxischen IAPP- und A β 40-Spezies die Bildung zytoto-

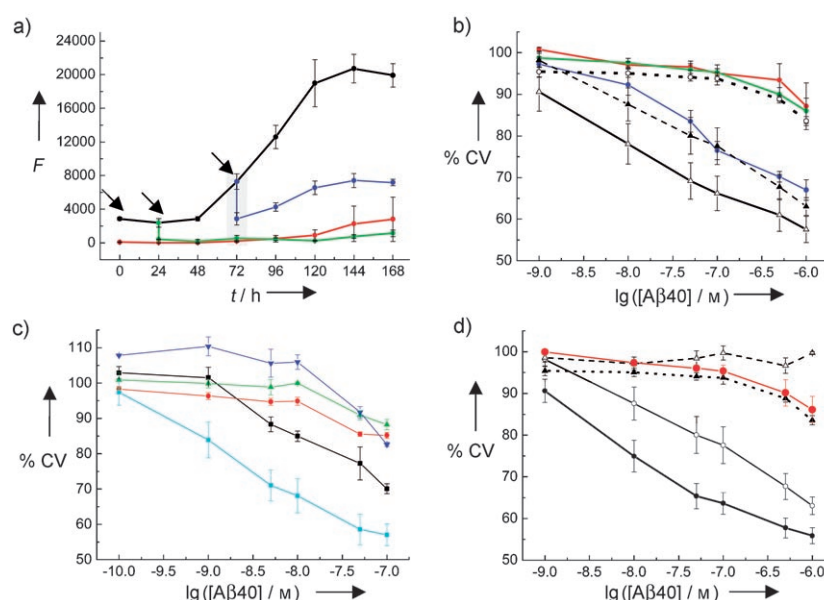


Abbildung 4. Inhibitorische Wirkung von IAPP-GI auf verschiedenen Stufen der zytotoxischen Oligomerisierung und Fibrillogenese von A β 40.

a) IAPP-GI blockiert die Fibrillogenese von A β 40 komplett vor und nach der Nucleation. A β 40 (16.5 μ M) wurde 7 Tage gealtert. Zu bestimmten Zeitpunkten (Pfeile) wurden Aliquote mit IAPP-GI (1:1) gemischt und Fibrillen mit dem ThT-Assay quantifiziert. A β 40 allein (schwarz); IAPP-GI + nichtgealtertes A β 40 (rot); IAPP-GI + 24 h gealtertes A β 40 (grün); IAPP-GI + 72 h gealtertes A β 40 (blau). Der graue Balken zeigt den Zeitpunkt der Zugabe der Lösungen zu den Zellen für die Bestimmung der Zytotoxizitäten in (b). Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus 3 Assays. b) IAPP-GI blockiert die Bildung von zytotoxischen A β 40-Aggregaten und dissoziiert bereits gebildete Aggregate, wenn es vor oder nach der Nucleation der A β 40-Fibrillogenese zugegeben wird. Lösungen aus (a) wurden nach 72 h zu PC-12-Zellen zugegeben, und die Zellvitalitäten wurden mit dem MTT-Assay bestimmt. Nichtgealtertes A β 40 (leere Kreise und gepunktete Linie); 24 h gealtertes A β 40 (schwarze Dreiecke); 72 h gealtertes A β 40 (leere Dreiecke); IAPP-GI + nichtgealtertes A β 40 (rot); IAPP-GI + 24 h gealtertes A β 40 (grün); IAPP-GI + 72 h gealtertes A β 40 (blau). Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus 3 Assays (je $n = 3$). c) IAPP-GI dissoziiert schon gebildete zytotoxische A β 40-Aggregate komplett. Ein 50facher molarer Überschuss an IAPP-GI wurde zu 7 Tage gealtertem, zytotoxischem und fibrillärem A β 40 (1.65 μ M) gegeben. Die Mischung und gealtertes A β 40 allein wurden dann weitere 7 Tage inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquote zu PC-12-Zellen gegeben und die Zytotoxizitäten mit dem MTT-Assay gemessen. 7 Tage gealtertes A β 40 allein nach weiteren 0–7 Tagen (hellblau); Mischung nach 0 h (schwarz), 1 Tag (rot), 3 Tagen (grün) und 7 Tagen (blau). In der gealterten A β 40-Lösung änderte sich die Zytotoxizität in weiteren 7 Tagen nicht, dagegen waren die zytotoxischen A β 40-Spezies 24 h nach der IAPP-GI-Zugabe fast komplett verschwunden. Daten sind aus 3 Bestimmungen (\pm Standardfehler). d) IAPP-GI blockiert die Umwandlung nichttoxischer präfibrillärer A β 40-Spezies in zytotoxische Spezies. A β 40 allein (16.5 μ M), IAPP-GI allein (16.5 μ M) und Mischungen von A β 40 mit IAPP-GI (je 16.5 μ M) wurden 7 Tage gealtert, und die Fibrillogenese wurde durch ein ThT-Assay verfolgt (a). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Lösungen zu PC-12-Zellen gegeben und die Zytotoxizitäten mit MTT-Reduktion gemessen. IAPP-GI allein (leere Dreiecke und gestrichelte Linie); A β 40 allein nach 0 h (schwarze Dreiecke und gepunktete Linie); A β 40 allein nach 24 h (leere Kreise und durchgezogene Linie); A β 40 allein zwischen 72 h und 7 Tagen (schwarze Kreise und durchgezogene Linie). IAPP-GI + nichtgealtertes A β 40 (rote Symbole und Linie) zwischen 0 h und 7 Tagen. Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus 3–6 Assays (je $n = 3$).

xischer Oligomere und Amyloidfibrillen der beiden Peptide A β 40 und IAPP unterdrückte, aber nicht verhindern konnte. Außerdem zeigten detaillierte Untersuchungen, dass nur die Wechselwirkungen zwischen frühen präfibrillären IAPP- und A β 40-Spezies die zytotoxische Selbstassoziation der beiden Polypeptide unterdrückten (siehe Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Direkte Beweise für die Bildung von A β 40/IAPP-Heterokomplexen wurden mithilfe von CD-spektroskopischen Untersuchungen sowie A β -Pull-down-Assays und Fluoreszenzspektroskopie erhalten (Abbildung 5c–e). Die Affinität der A β 40/IAPP-Wechselwirkung (app. K_d) wurde fluoreszenzspektroskopisch durch Titration von N $^{\alpha}$ -aminoterminal Fluorescein-markiertem IAPP (1 nM) mit A β 40 bestimmt und lag bei (48.5 ± 4.2) nM (Abbildung 5d,e).

Als nächstes wurden die A β 40/IAPP-GI- und A β 40/IAPP-Heterokomplexe durch Vernetzen mit Glutaraldehyd stabilisiert und mit NuPAGE und einem Western-Blot cha-

rakterisiert. Der Blot mit dem Anti-A β 40-Antikörper zeigte, dass sich in der Mischung doppelt so viele Trimere gebildet hatten wie bei der Inkubation von A β 40 allein. Außerdem wies der Anti-A β 40-Blot auch auf die Bildung signifikanter Mengen niedermolekularer Oligomere (Tetra-, Penta- und Hexamere) hin, die bei der Inkubation von A β 40 allein nicht auftraten (Abbildung 5f sowie Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Die Western-Blot-Analyse mit dem Anti-IAPP-Antikörper wies auch auf die Bildung größerer Mengen an Tri- bis Hexameren in den Mischungen hin, die geringere Molekulargewichte als die entsprechenden Aggregate in den IAPP- oder IAPP-GI-Inkubationen hatten (Abbildung 5f). Diese Ergebnisse deuteten an, dass Tri- bis Hexamere die Hauptspezies unter den Heterooligomeren der Mischungen waren.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben folgende biomedizinische Implikationen: 1) Das speziell entwickelte Polypeptid IAPP-GI aus 37 Aminosäureresten bindet mit

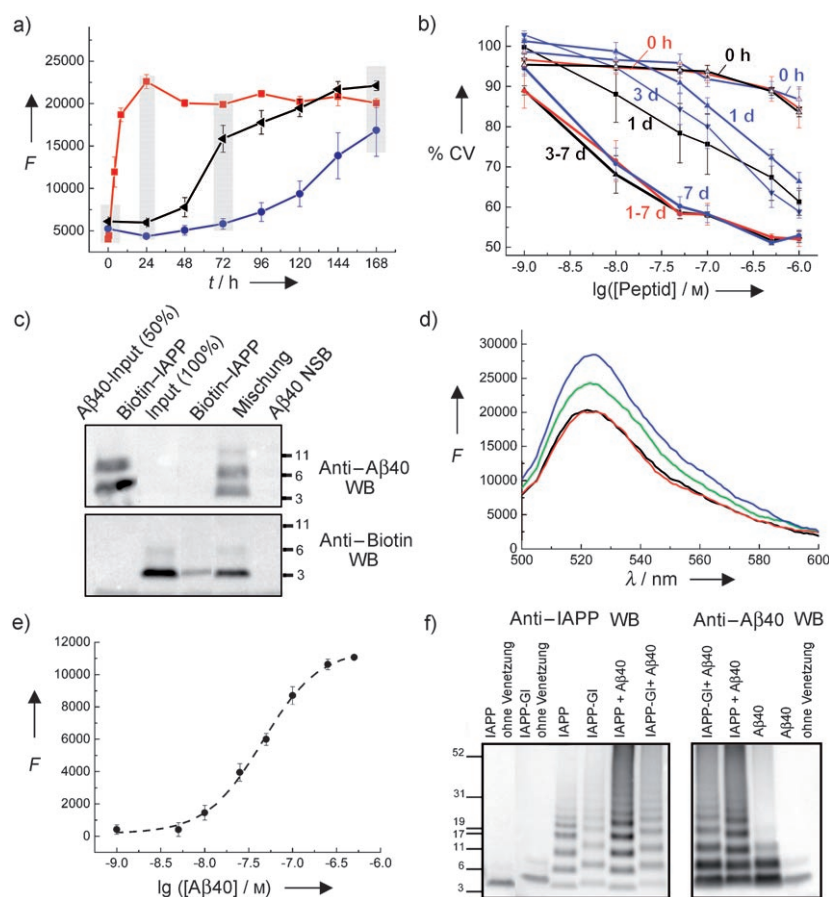


Abbildung 5. Unterdrückung der Bildung zytotoxischer A β 40- und IAPP-Oligomere und -Fibrillen durch die Bildung hochaffiner, löslicher A β 40/IAPP-Heteroaggregate. a) IAPP verzögert die A β 40-Fibrillogenese und umgekehrt. ThT-Bindungsassay der Fibrillogenese von A β 40 allein (schwarz; 16.5 μ M), IAPP allein (rot; 16.5 μ M) und einer Mischung von A β 40 mit IAPP (je 16.5 μ M; blau). Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus 8 Assays. Die grauen Balken zeigen die Zeitpunkte der Zugabe der Lösungen zu den PC-12-Zellen in (b). b) Die Wechselwirkung von A β 40 mit IAPP verzögert die Bildung von zytotoxischen A β 40- und IAPP-Spezies, kann diese aber nicht verhindern. Inkubationen von A β 40 (schwarz), IAPP (rot) und Mischungen von präfibrillärem A β 40 mit IAPP (1:1, blau) wurden 7 Tage gealtert, und die Fibrillogenese wurde durch einen ThT-Bindungsassay quantifiziert (a). Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Lösungen zu PC-12-Zellen gegeben und die Zytotoxizitäten durch einen MTT-Reduktionsassay bestimmt. Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus 3–4 Assays (je $n=3$) mit Ausnahme des Ansatzes der 7 Tage gealterten Mischungen (2 Assays, je $n=3$). c) Biotin-pull-down-Assay der Bindung von A β 40 an Biotin-IAPP. Oben: Anti-A β 40-Western-Blot einer Mischung von A β 40 (5 μ M) und Biotin-IAPP (2.5 μ M) gegen A β 40 allein (5 μ M) nach Biotin-pull-down und Peptiddissoziation. A β 40-Input: Input (50%) (frisch gelöstes Peptid (4 μ g), nicht inkubiert mit Kügelchen); Biotin-IAPP-Input: Input (100%, 4 μ g); Biotin-IAPP: Biotin-IAPP allein; Mischung: 1:2-Mischung von Biotin-IAPP und A β 40; A β 40 NSB: A β 40 allein (NSB für Spur „Mischung“). Unten: Anti-Biotin-Western-Blot der gleichen Lösungen. Die Blots sind repräsentativ für 3 Experimente. d) Bindung von A β 40 an Fluos-IAPP bestimmt mit Fluoreszenzspektroskopie: Spektren von Fluos-IAPP allein (1 nM; schwarz) und nach Titration mit A β 40 im molaren Verhältnis Fluos-IAPP/A β 40 1:1 (rot), 1:25 (grün) und 1:100 (blau). e) Bindungskurve (gestrichelte Linie) von Fluos-IAPP (1 nM) nach Titration mit A β 40 (5 d). F : Fluoreszenz bei 522 nm. Daten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler) aus 3 Bindungskurven. f) Charakterisierung der Heteroaggregate von A β 40 mit IAPP-GI oder IAPP durch Vernetzen mit Glutaraldehyd, NuPAGE und Western-Blot-Analyse. Links: Western-Blot mit Anti-IAPP-Antikörper. Von links nach rechts: IAPP und IAPP-GI-Input (3 μ g, 100%) ohne Vernetzen und ohne Inkubation, IAPP allein und IAPP-GI allein inkubiert sowie vernetzt (Blindproben für die Mischungen), 1:1-Mischungen von A β 40 mit IAPP und IAPP-GI inkubiert und vernetzt. Rechts: Western-Blot mit Anti-A β 40-Antikörper. Von links nach rechts: 1:1-Mischungen von A β 40 mit IAPP-GI und IAPP inkubiert und vernetzt, A β 40 allein inkubiert und vernetzt (Blindproben für die Mischungen), A β 40-Input (3 μ g, 100%) ohne Vernetzen und ohne Inkubation. In allen Spuren wurden gleiche Mengen von IAPP, IAPP-GI und A β 40 geladen. Repräsentative Blots aus 4 Assays sind gezeigt.

einer Affinität im unteren nanomolaren Bereich an A β 40. Es blockiert zudem die zytotoxische Oligomerisierung und Fibrillogenese von A β 40 mit einer ähnlich hohen Aktivität (Abbildung 6a). IAPP-GI ist somit einer der wirksamsten A β 40-Liganden und Inhibitoren der zytotoxischen Selbstassoziation von A β 40.^[19,20] 2) IAPP-GI ist der einzige Peptidabkömmling, der sowohl IAPP als auch A β 40 mit hoher Affinität bindet und ihre zytotoxische Selbstassoziation blockiert und sogar rückgängig macht. Da AD und T2D mit fortschreitendem Alter verstärkt auftreten und AD-Kranke häufig auch unter T2D leiden (und umgekehrt), könnte IAPP-GI das erste peptidische „Kreuz-Amyloid-Krankheit-Therapeutikum“ werden.^[4,5] Schließlich zeigt unser Befund, dass A β 40 IAPP mit einer Affinität im unteren nanomolaren Bereich bindet, und dass die A β 40/IAPP-Heteroassoziation die zytotoxische Selbstassoziation beider Peptide unterdrückt, einen möglichen molekularen Zusammenhang zwischen AD und T2D. Unsere Ergebnisse stützen entsprechend die Hypothese, dass sich die inhärent entfalten Polypeptide A β 40 und IAPP mit extrem hoher Selbstassoziationsneigung in vivo durch Heteroassoziation ihrer frühen präfibrillären und noch nicht toxischen Konformationen gegenseitig vor der zytotoxischen Fehlfaltung und Selbstassoziation „schützen“ könnten (Abbildung 6b). Solch ein „Unterdrückungsmechanismus“ für Amyloid-Krankheiten würde mit den Berichten übereinstimmen, die das Ausbrechen von AD und T2D miteinander in Verbindung bringen.^[4,5] Da A β 40 und IAPP im Serum und in der cerebrospinalen Flüssigkeit in vergleichbaren subnanomolaren Konzentrationen vorkommen, wäre eine In-vivo-Kreuzwechselwirkung möglich.

Zusammenfassend hat unsere Studie eine bisher nicht erkannte Wechselwirkung zwischen den beiden Schlüsselmolekülen von AD und T2D identifiziert. Dies deutet auf einen möglichen molekularen Zusammenhang zwischen den beiden Krankheiten hin. Darüber hinaus ergibt sich aus unseren Untersuchungen eine hoch-

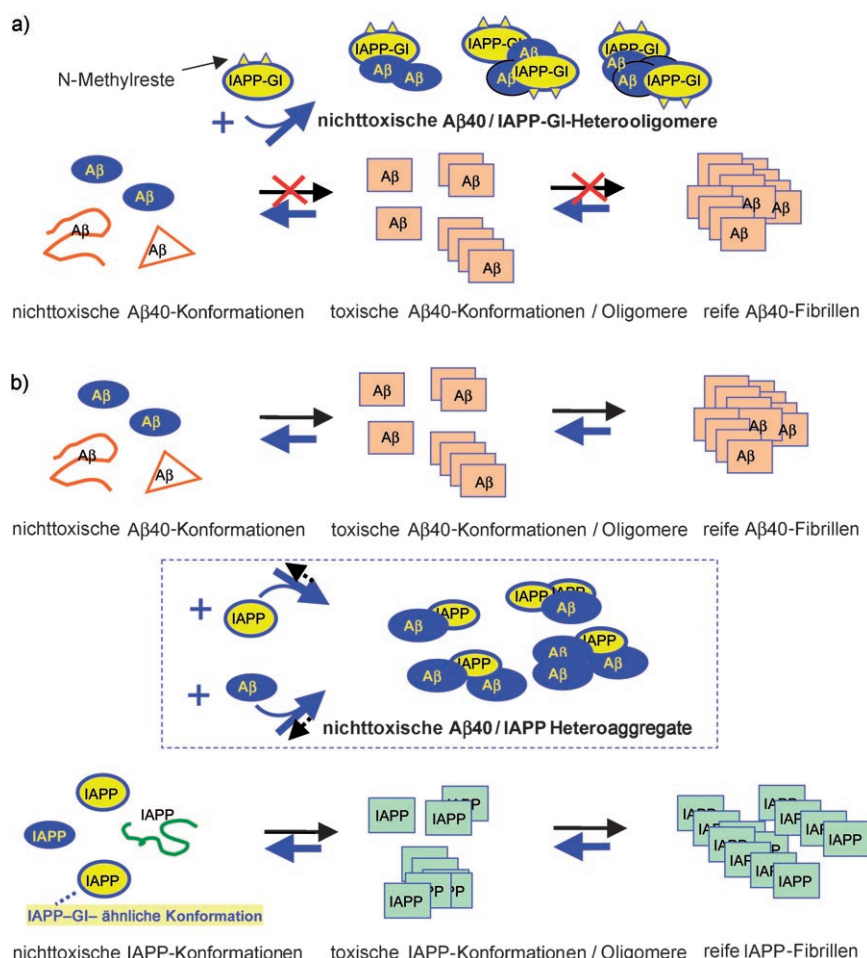


Abbildung 6. Modelle für die Wechselwirkungen von a) IAPP-GI mit frühen präfibrillären Aβ40-Spezies, die zur Inhibition und Umkehrung der zytotoxischen Oligomerisierung und Fibrillenbildung von Aβ40 führen (blaue Pfeile), und b) frühem präfibrillärem IAPP mit Aβ40-Spezies, die die zytotoxische Selbstassoziation und Fibrillogenese der Polypeptide Aβ40 und IAPP unterdrückt (blaue Pfeile). Dem Modell nach kommt es zu einer Sequestrierung von frühen präfibrillären und nichttoxischen Vorstufen zytotoxischer Aβ40-Aggregate in Form löslicher und nichttoxischer Heterooligomere wegen ihrer hochaffinen Bindung an IAPP-GI (a) oder an ein frühes präfibrilläres und nichttoxisches IAPP-Konformer, z. B. ein IAPP-GI-ähnliches Konformer, in Konkurrenz zur Selbstassoziation von Aβ40 oder IAPP (b). Aufgrund der hohen konformativen Flexibilität und der starken Neigung der Polypeptide IAPP und Aβ40 zur Bildung von β-Faltblattstrukturen und zur Selbstassoziation sollten jedoch Selbstassoziationsprozesse sowie Homo- und Hetero-Nucleationsprozesse mit der Bildung von Aβ40/IAPP-Heterokomplexen konkurrieren, ihre Stabilität beeinträchtigen und die Heteroassoziation zugunsten der Selbstassoziation zurückdrängen können (b). Dagegen sollten Aβ40/IAPP-GI-Heterooligomere wegen der N-Methylierung der Amyloidkernregion von IAPP-GI nicht in der Lage sein, eine β-Faltblattstruktur und somit die zytotoxische Selbstassoziation und Fibrillogenese von Aβ40 zu propagieren; dies würde mit der hohen Wirksamkeit der inhibitorischen IAPP-GI-Effekte übereinstimmen (a).

wirksame Leitstruktur für das Design von neuen Therapeutika für die beiden bisher noch unheilbaren Amyloid-Krankheiten AD und T2D.

Eingegangen am 3. Oktober 2006
Online veröffentlicht am 4. Januar 2007

Stichwörter: β-Amyloidpeptide · Alzheimer-Erkrankung · Proteinaggregation · Protein-Design · Typ-II-Diabetes

- [1] P. Westermark, *FEBS J.* **2005**, 272, 5942–5949.
- [2] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, 426, 884–890.
- [3] C. Soto, *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, 4, 49–60.
- [4] M. R. Nicolls, *Curr. Alzheimer Res.* **2004**, 1, 47–54.
- [5] J. Janson, T. Laedtke, J. E. Parisi, P. O'Brien, R. C. Petersen, P. C. Butler, *Diabetes* **2004**, 53, 474–481.
- [6] D. J. Selkoe, *Phys. Rev. B* **2001**, 81, 741–766.
- [7] W. F. DeGrado, *Adv. Protein Chem.* **1988**, 39, 51–124.
- [8] V. N. Uversky, A. L. Fink, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1698, 131–153.
- [9] B. O'Nuallain, A. D. Williams, P. Westermark, R. Wetzel, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 17490–17499.
- [10] Y. Mazar, S. Gilead, I. Benhar, E. Gazit, *J. Mol. Biol.* **2002**, 322, 1013–1024.
- [11] K. Tenidis, M. Waldner, J. Bernhagen, W. Fischle, M. Bergmann, M. Weber, M.-L. Merkle, W. Voelter, H. Brunner, A. Kapurniotu, *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 1055–1071.
- [12] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16742–16747.
- [13] L. M. Yan, M. Taterek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 2046–2051.
- [14] M. S. Shearman, C. I. Ragan, L. L. Iversen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 1470–1474.
- [15] M. Taterek-Nossol, L. M. Yan, A. Schmauder, K. Tenidis, G. Westermark, A. Kapurniotu, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 797–809.
- [16] H. LeVine III in *Methods in Enzymology: Amyloid, Prions, and other Protein Aggregates*, Vol. 309 (Hrsg.: R. Wetzel), Academic Press, San Diego, **1999**, S. 274–284.
- [17] M. R. Eftink in *Methods in Enzymology: Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 278 (Hrsg.: L. Brand, M. L. Johnson), Academic Press, San Diego, **1997**, S. 221–257.
- [18] D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, D. J. Selkoe, *Nature* **2002**, 416, 535–539.
- [19] F. E. Cohen, J. W. Kelly, *Nature* **2003**, 426, 905–909.
- [20] E. Gazit, *FEBS J.* **2005**, 272, 5971–5978.