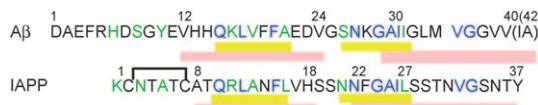


# Hot-Spot-Regionen der A $\beta$ -IAPP-Wechselwirkungsdomänen als hochaffine Bindungsstellen bei Kreuz- und Selbstassoziation\*\*

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

Die Aggregation von Proteinen zu zelltoxischen Aggregaten und Amyloidfibrillen spielt bei der Zelldegeneration und der Pathogenese einer Reihe von unheilbaren Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit (AD) und der Typ-2-Diabetes (T2D) eine Rolle.<sup>[1,2]</sup> Die aus 40 oder 42 Aminosäureresten bestehenden  $\beta$ -Amyloidpeptide A $\beta$ 40 bzw. A $\beta$ 42 und das aus 37 Resten bestehende Inselamyloid-Polypeptid (IAPP) sind die Schlüssel-Amyloidpeptide bei der AD bzw. beim T2D.<sup>[1,2]</sup>

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass zusätzlich zu den Selbstwechselwirkungen, die der pathogenen Selbstassoziation der Proteine zugrundeliegen, auch Kreuzwechselwirkungen zwischen Amyloiden eine kritische Rolle bei der Proteinaggregation spielen.<sup>[3-11]</sup> Beispiele solcher Wechselwirkungen sind die A $\beta$ -Tau-, die A $\beta$ - $\alpha$ -Synuclein-, die A $\beta$ -Transthyretin- und die IAPP-Insulin-Wechselwirkung.<sup>[7,9,11,12]</sup> Eine weitere derartige Wechselwirkung ist die A $\beta$ 40-IAPP-Wechselwirkung (Abbildung 1).<sup>[3]</sup> Diese 2007 in



**Abbildung 1.** Primärsequenzen von A $\beta$  und IAPP. In beiden Sequenzen identische Reste sind in Blau und ähnliche in Grün hervorgehoben.<sup>[3,10]</sup> Die kürzesten Sequenzen mit dem stärksten Identitäts- und Ähnlichkeitsgrad sind gelb unterstrichen. Die Domänen, für die bisher eine Beteiligung an der Selbstassoziation vorgeschlagen wurde, sind rosa unterstrichen.<sup>[6,18-23]</sup>

vitro identifizierte Wechselwirkung zwischen frühen nichtfibrillären und nichttoxischen A $\beta$ 40- und IAPP-Spezies zeichnet sich durch eine Affinität im unteren nanomolaren Bereich aus und ist in der Lage, die zelltoxischen Selbstassoziations- und Amyloidbildungsprozesse der beiden Polypeptide A $\beta$ 40 und IAPP zu unterdrücken.<sup>[3]</sup> Diese Befunde haben zu der Hypothese geführt, dass die A $\beta$ 40-IAPP-Heteroassoziation ein molekularer Zusammenhang zwischen AD und T2D sein könnte. Diese Annahme ist in Einklang mit klinischen und epidemiologischen Hinweisen auf eine Verbindung zwischen den beiden Krankheiten.<sup>[13,14]</sup> Da A $\beta$  und IAPP im Serum und in der cerebrospinalen Flüssigkeit in ähnlichen Konzentrationen vorkommen, wäre auch eine In-vivo-Wechselwirkung möglich. Tatsächlich ergaben neueste immunhistochemische Untersuchungen eine Colokalisierung von A $\beta$  und IAPP in pankreatischen Inselamyloid-Aggregaten von T2D-Patienten.<sup>[15]</sup> Die Aufklärung der molekularen Determinanten der Hetero- und der Selbstassoziation von A $\beta$  und IAPP ist von großer biomedizinischer Bedeutung, da hierdurch einerseits die mögliche Verbindung dieser Prozesse mit der Krankheitspathogenese aufgedeckt werden könnte und man andererseits in der Lage wäre, chemische Stoffe, die als Modulatoren dieser Prozesse fungieren könnten, zu entwerfen.

A $\beta$  und IAPP sind konformativ ungeordnete, aber dennoch stark zur Aggregation neigende Polypeptide.<sup>[16,17]</sup> Ihre Peptidsequenzen sind zu rund 25 % identisch und zu rund 50 % ähnlich; dabei lässt sich die höchste Identität und Ähnlichkeit bei Sequenzen feststellen, die eine wichtige Rolle bei der Selbstassoziation der beiden Peptide spielen (überlappende gelbe und rosa Bereiche in Abbildung 1).<sup>[6,18-22]</sup> Hier stellen wir eine Reihe systematischer Untersuchungen zu den Wechselwirkungsdomänen von A $\beta$  und IAPP für die Kreuz- und die Selbstassoziation vor. Dabei werden kurze Peptidsequenzen in A $\beta$  und IAPP identifiziert, die als „Hot-Spot“-Regionen der A $\beta$ -IAPP-Wechselwirkungsdomänen fungieren, d.h. als die kürzesten Peptidsequenzen, die noch in der Lage sind, mit dem jeweils anderen Peptid mit Bindungsaaffinitäten im nano- bis niedrig mikromolaren Bereich zu interagieren. Ferner zeigen wir, dass die identifizierten Peptidsequenzen sowohl A $\beta$  als auch IAPP mit hoher Affinität binden können. Dieser Befund weist darauf hin, dass gemeinsame molekulare Erkennungsmerkmale der Amyloid-Selbst- und der Amyloid-Heteroassoziation zugrundeliegen.

Zunächst gingen wir der Frage nach, welche A $\beta$ 40-Domänen an IAPP binden. Dazu nutzten wir membrangebundene Peptidarrays aus A $\beta$ 40-Dekapeptiden, die die A $\beta$ 40-Gesamtsequenz abdeckten und sich jeweils durch die Verschiebung um eine Aminosäure auseinander ableiteten (Abbildung 2).<sup>[24]</sup> Die Membranen wurden mit synthetischem

[\*] E. Andreetto, Dr. L.-M. Yan, Dr. A. Velkova, Prof. Dr. A. Kapurniotu Fachgebiet Peptidbiochemie, Center of Integrated Protein Science Technische Universität München

Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising-Weihenstephan (Deutschland)  
Fax: (+49) 8161-713-298

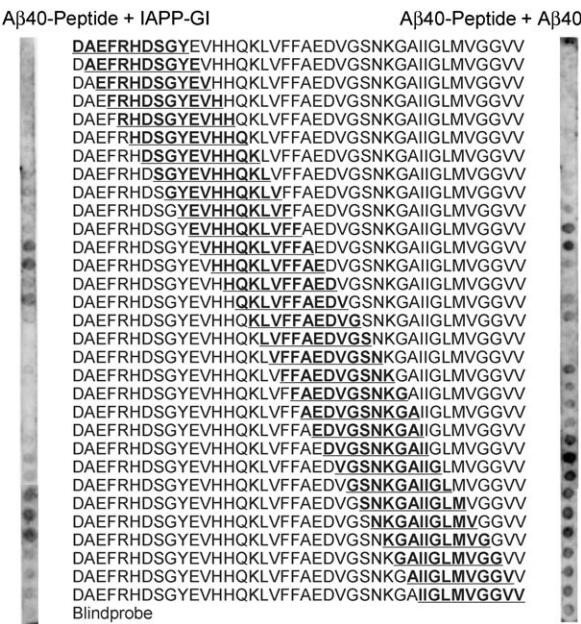
E-Mail: [akapurniotu@wzw.tum.de](mailto:akapurniotu@wzw.tum.de)  
Homepage: <http://www.wzw.tum.de/pbch>

M. Tatarek-Nossol  
Lehrstuhl für Biochemie und Molekulare Zellbiologie  
RWTH Aachen (Deutschland)

Dr. R. Frank  
Abteilung Chemische Biologie  
Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung  
Braunschweig (Deutschland)

[\*\*] E. Andreetto und L.-M. Yan haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert. Wir danken J. Bernhagen für Hilfe bei der Übersetzung des Manuskripts und S. Daenicker für die Synthese von Peptidarrays.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200904902> zu finden.



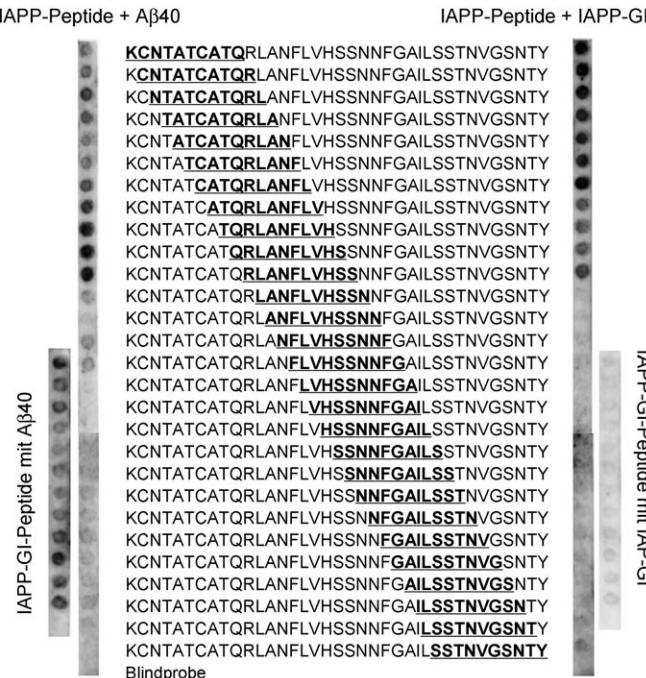
**Abbildung 2.** Identifizierung der A $\beta$ 40-Regionen, die IAPP (IAPP-GI) (links) oder A $\beta$ 40 (rechts) binden. Die fett und unterstrichen gekennzeichneten Dekamere wurden mit Biotin-IAPP-GI (links) oder mit Biotin-A $\beta$ 40 (rechts) inkubiert. Gebundenes Biotin-IAPP-GI oder Biotin-A $\beta$ 40 wurde nach Inkubation mit Streptavidin-POD und Entwicklung mittels ECL detektiert. Repräsentative Membranen aus 2–3 Assays sind gezeigt.

$N^{\alpha}$ -aminoterminale biotinylierte IAPP-GI (Biotin-IAPP-GI) inkubiert.<sup>[25]</sup> Das doppelt N-methylierte IAPP-Mimetikum [(N-Me)G24,(N-Me)I26]-IAPP (IAPP-GI) wurde wegen seiner exzellenten Löslichkeit und seines nichtamyloidogenen Charakters als Ersatzmolekül für das schlecht lösliche und stark zur Aggregation neigende IAPP eingesetzt,<sup>[25]</sup> zumal es, wie wir vor kurzem zeigen konnten,  $\text{A}\beta$ 40 mit der gleichen Affinität wie nichtaggregiertes IAPP bindet.<sup>[3]</sup>  $\text{A}\beta$ 40-Dekamere, die Biotin-IAPP-GI gebunden hatten, wurden durch die anschließende Inkubation der Peptidmembran mit Streptavidin-konjugierter Peroxidase (POD) identifiziert (Abbildung 2). Dabei wurden zwei Gruppen von 3–4 konsekutiven Peptidsequenzen identifiziert: Die erste Gruppe befindet sich in der Peptidregion  $\text{A}\beta$ (12–24) und die zweite im Bereich  $\text{A}\beta$ (26–37).

Die identifizierten IAPP-bindenden  $\text{A}\beta$ 40-Regionen enthalten die Peptidsequenzen, die Hauptbereiche der  $\beta$ -Strände von  $\text{A}\beta$ 40-Amyloidfibrillen sind (rosa in Abbildung 1).<sup>[19,26-28]</sup> Daher wiesen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die an der  $\text{A}\beta$ 40-IAPP-Heteroassoziation beteiligten  $\text{A}\beta$ 40-Regionen auch an der  $\text{A}\beta$ 40-Selbstassoziation teilnehmen könnten. Um diese Annahme zu testen, wurde die Membran aus den  $\text{A}\beta$ 40-Dekameren mit synthetischem  $\text{N}^{\alpha}$ -aminoterminal biotinyliertem  $\text{A}\beta$ 40 (Biotin- $\text{A}\beta$ 40) inkubiert. Anschließend wurden die Peptidsequenzen, die Biotin- $\text{A}\beta$ 40 gebunden hatten, mittels Inkubation mit Streptavidin-POD identifiziert (Abbildung 2). Es stellte sich heraus, dass sich die  $\text{A}\beta$ 40-Regionen, die Biotin- $\text{A}\beta$ 40 gebunden hatten, innerhalb der Regionen  $\text{A}\beta$ (11-21) und  $\text{A}\beta$ (23-37) befanden. Diese

Sequenzen entsprechen in der Tat den Regionen, die an der A $\beta$ 40-IAPP-Heteroassoziation beteiligt sind (Abbildung 2).

Um die IAPP-Regionen, die an  $\text{A}\beta 40$  binden, zu identifizieren, nutzten wir membrangebundene Peptidarrays aus IAPP-Dekapeptiden, die die IAPP-Gesamtsequenz abdeckten und sich jeweils durch die Verschiebung um eine Aminosäure auseinander ableiteten (Abbildung 3). Diese IAPP-



**Abbildung 3.** Identifizierung der IAPP-Regionen, die A $\beta$ 40 (links) oder IAPP (IAPP-GI) (rechts) binden. Die fett und unterstrichen gekennzeichneten Dekamere wurden mit A $\beta$ 40 (links) oder Biotin-IAPP-GI (rechts) inkubiert. Gebundenes A $\beta$ 40 oder Biotin-IAPP-GI wurde nach Inkubation mit anti-A $\beta$ 40-Antikörpern bzw. Streptavidin-POD und ECL detektiert. Die Membranen links unten oder rechts unten enthalten Dekamere, die den Bereich IAPP-GI(15–35) umfassen und deren Bindung an A $\beta$ 40 (unten links) oder an IAPP-GI (unten rechts) ebenfalls untersucht wurde. Repräsentative Membranen aus 2–3 Assays sind gezeigt.

Peptidarraymembranen wurden mit A $\beta$ 40 inkubiert. Anschließend wurden die A $\beta$ 40-bindenden Peptidsequenzen mittels Inkubation mit einem Anti-A $\beta$ 40-Antikörper identifiziert. Es ergab sich, dass alle Peptide innerhalb des N-terminalen Bereichs IAPP(1–20) an A $\beta$ 40 banden (Abbildung 3). Da jedoch auch einige der Peptidsequenzen innerhalb von IAPP(21–37) schwach an A $\beta$ 40 gebunden hatten und um die Möglichkeit auszuschließen, dass die ausgeprägte Hydrophobie und Selbstassoziationsneigung dieser membrangebundenen Peptidsequenzen ihre Wechselwirkung mit A $\beta$ 40 verhindert haben könnte, wurde anschließend auch für eine Peptidarraymembran, die aus zwölf nichtamyloidogenen, doppelt N-methylierten (an G24 und I26) Dekapeptiden bestand und den Sequenzbereich IAPP-GI(15–35) abdeckte, die Bindung an A $\beta$ 40 untersucht. Auch die meisten dieser Peptidsequenzen banden an A $\beta$ 40 (Abbildung 3, linker unterer Bereich). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass

in IAPP zwei  $\text{A}\beta$ 40-Bindungsbereiche existieren: Der erste Bereich befindet sich innerhalb der Sequenz IAPP(8–20) und der zweite im Bereich IAPP(23–35).

Die identifizierten  $\text{A}\beta$ 40-bindenden IAPP-Regionen enthielten Peptidsequenzen, die gemäß mehrerer Veröffentlichungen auch an der IAPP-Selbstassoziation zu Amyloidfibrillen beteiligt sind.<sup>[6,18,20–22,29]</sup> Daher untersuchten wir als Nächstes die Bindung der IAPP-Peptidarraymembran an Biotin-IAPP-GI. Dabei ergab sich, dass alle IAPP-Dekamere des IAPP(1–20)-Bereichs stark an Biotin-IAPP-GI binden und dass zusätzlich für die Sequenzen des C-terminalen IAPP-Bereichs eine schwache Wechselwirkung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3).<sup>[21]</sup> Somit sollten die IAPP-Regionen, die für die IAPP- $\text{A}\beta$ 40-Heteroassoziation wichtig sind, auch bei der IAPP-Selbstassoziation eine wichtige Rolle spielen.

Um die obigen Befunde zu bestätigen und die Wechselwirkungsdomänen zwischen  $\text{A}\beta$ 40 und IAPP genauer zu charakterisieren, synthetisierten wir eine Vielzahl an  $\text{A}\beta$ 40- und IAPP-Teilsequenzen sowie ihre fluoreszenzmarkierten Analoga und charakterisierten ihre Wechselwirkungen mit IAPP und  $\text{A}\beta$ 40 mit Fluoreszenztitrationsbindungsassays (Tabellen 1 und 2).<sup>[3,25]</sup> Um die  $\text{A}\beta$ 40-Sequenzen, die an IAPP binden, genau zu bestimmen, wurde zunächst  $\text{N}^{\alpha}$ -aminoterminale fluoresceinmarkiertes IAPP (Fluos-IAPP) mit den zwei  $\text{A}\beta$ 40-Hauptsegmenten  $\text{A}\beta$ (1–28) und  $\text{A}\beta$ (29–40) titriert. Diese zwei Segmente entsprechen dem extrazellulären hydrophilen bzw. dem transmembranären hydrophoben  $\text{A}\beta$ 40-Sequenzbereich und tragen jeweils einen Strang zum  $\beta$ -Faltblatt der  $\text{A}\beta$ 40-Amyloidfibrille bei (Abbildung 1).<sup>[19]</sup> Beide Segmente banden an IAPP. Dabei erwies sich  $\text{A}\beta$ (29–40) als der stärkere ( $K_{d,\text{app.}} = 200 \text{ nM}$ ) und  $\text{A}\beta$ (1–28) als der schwächere Ligand ( $K_{d,\text{app.}} = 2.5 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Tabelle 1). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass der hydrophobe C-terminale Sequenzbereich  $\text{A}\beta$ (29–40) eine kritische Rolle bei der  $\text{A}\beta$ 40-IAPP-Wechselwirkung spielt.<sup>[3]</sup>

Um die kürzesten  $\text{A}\beta$ 40-Sequenzen, die in der Lage sind, IAPP zu binden, zu identifizieren, wurden mehrere  $\text{A}\beta$ 40-Peptidsequenzen durch systematische Verkürzung von  $\text{A}\beta$ (1–28) und  $\text{A}\beta$ (29–40) vom C- und N-Terminus her oder basierend auf Strukturmodellen von  $\text{A}\beta$ 40 synthetisiert und ihre Wechselwirkung mit IAPP untersucht (Tabelle 1; Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).<sup>[19,28,30]</sup> Wurde IAPP-GI anstelle von IAPP verwendet, wurden sehr ähnliche Bindungsaffinitäten erhalten (Daten nicht gezeigt).  $\text{A}\beta$ (27–32) (=NKGAI) und  $\text{A}\beta$ (35–40) (=MVGGVV) wurden als die kürzesten Peptidsequenzen identifiziert, die noch in der Lage sind, IAPP mit einer Affinität im nanomolaren Bereich zu binden. Innerhalb des Sequenzbereichs  $\text{A}\beta$ (1–28) erwiesen sich  $\text{A}\beta$ (18–21) (=VFFA) und  $\text{A}\beta$ (19–22) (=FFAE) als die kürzesten Sequenzen, die IAPP noch binden konnten. Ihre Affinitäten lagen im niedrig mikromolaren Bereich und somit im gleichen Bereich wie die Bindungsaffinität der  $\text{A}\beta$ (1–28)-IAPP-Wechselwirkung.

Als Nächstes untersuchten wir die Wechselwirkungen der identifizierten IAPP-bindenden  $\text{A}\beta$ 40-Peptidsequenzen mit  $\text{A}\beta$ 40 (Tabelle 1; Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Sowohl  $\text{A}\beta$ (27–32) als auch  $\text{A}\beta$ (35–40) interagierten mit  $\text{A}\beta$ 40. Dabei waren die scheinbaren Dissoziationskon-

**Tabelle 1:** Identifizierung der  $\text{A}\beta$ 40-Hot-Spot-Regionen (fett), die Volllängen-IAPP und - $\text{A}\beta$ 40 binden, und Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstanten ( $K_{d,\text{app.}}$ ) mit Fluoreszenztitrationsbindungsassays.<sup>[a]</sup>

$\text{A}\beta$ 40-Sequenz	$K_{d,\text{app.}}$ (für IAPP) <sup>[b,c]</sup>	$K_{d,\text{app.}}$ (für $\text{A}\beta$ 40) <sup>[b,c]</sup>
$\text{A}\beta$ 40	48.5 nM ( $\pm 4.2$ ) <sup>[3]</sup>	198 nM ( $\pm 43$ )
$\text{A}\beta$ (1–28)	2.5 $\mu\text{M}$	711 nM
$\text{A}\beta$ (12–28)	2.8 $\mu\text{M}$	n.b.
$\text{A}\beta$ (15–24)	6.4 $\mu\text{M}$ ( $\pm 1.0$ )	1.0 $\mu\text{M}$ ( $\pm 0.1$ )
$\text{A}\beta$ (15–21)	14.0 $\mu\text{M}$	2.9 $\mu\text{M}$
$\text{A}\beta$ (16–21)	13.8 $\mu\text{M}$	n.b.
$\text{A}\beta$ (18–21)	2.1 $\mu\text{M}$	–
$\text{A}\beta$ (19–21)	–	n.b.
<b><math>\text{A}\beta</math>(19–22)</b>	7.0 $\mu\text{M}$ ( $\pm 0.7$ )	5.5 $\mu\text{M}$ ( $\pm 0.6$ )
$\text{A}\beta$ (29–40)	200 nM	463 nM
$\text{A}\beta$ (25–35)	282 nM ( $\pm 29$ )	326 nM ( $\pm 61$ )
<b><math>\text{A}\beta</math>(27–32)</b>	477 nM ( $\pm 114$ ) <sup>[d]</sup>	282 nM ( $\pm 47$ )
$\text{A}\beta$ (28–32)	–	–
$\text{A}\beta$ (27–31)	–	–
<b><math>\text{A}\beta</math>(35–40)</b>	354 nM ( $\pm 36$ )	358 nM ( $\pm 25$ )
$\text{A}\beta$ (35–39)	3.1 $\mu\text{M}$	4.1 $\mu\text{M}$
$\text{A}\beta$ (35–38)	–	–
$\text{A}\beta$ (36–40)	–	28.6 $\mu\text{M}$

[a] Die Titrationen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) und 1% HFIP durchgeführt, wobei  $\text{N}^{\alpha}$ -aminoterminale fluoreszenzmarkiertes IAPP oder  $\text{A}\beta$ 40 mit den  $\text{A}\beta$ 40-Segmenten titriert wurde.<sup>[3,25]</sup>

[b] Die  $K_{d,\text{app.}}$ -Werte wurden aus einer oder drei Bindungskurven bestimmt; in Klammern sind die Standardfehler für den Fall von drei Bindungskurven angegeben. [c] –: keine Bindung bei Konzentrationen  $\leq 20 \mu\text{M}$ ; n.b. = nicht bestimmt. [d]  $K_{d,\text{app.}}$  der Wechselwirkung  $\text{A}\beta$ (27–32)-IAPP-GI.

stanten ( $K_{d,\text{app.}}$ ) fast die gleichen wie für die Wechselwirkung mit IAPP. Peptide mit kürzeren Sequenzabschnitten als  $\text{A}\beta$ (27–32) oder  $\text{A}\beta$ (35–40) banden nicht oder nur schwach an  $\text{A}\beta$ 40. Die Sequenz  $\text{A}\beta$ (19–22) erwies sich als die kürzeste Sequenz innerhalb  $\text{A}\beta$ (1–28), die  $\text{A}\beta$ 40 noch binden konnte, allerdings lag auch diese Bindungsaffinität im niedrig mikromolaren Bereich. Die Ergebnisse der Fluoreszenztitrationsbindungsassays waren in Einklang mit den Befunden der Peptidarrays. Darüber hinaus führten sie zur Identifizierung der zwei Hexapeptidsequenzen  $\text{A}\beta$ (27–32) und  $\text{A}\beta$ (35–40) und der Tetrapeptidsequenz  $\text{A}\beta$ (19–22) als den kürzesten  $\text{A}\beta$ 40-Sequenzen, die sowohl IAPP als auch  $\text{A}\beta$ 40 mit Affinitäten im nano- oder niedrig mikromolaren Bereich binden (Tabelle 1). Die Ergebnisse der beiden Assays sind in Abbildung 4 zusammengefasst.

Um die kürzesten IAPP-Sequenzen zu identifizieren, die noch  $\text{A}\beta$ 40 binden können, wurde IAPP zunächst in IAPP(1–18) und IAPP(19–37) zerlegt, und es wurden die Wechselwirkungen dieser Sequenzbereiche mit  $\text{A}\beta$ 40 untersucht.<sup>[17]</sup> IAPP(1–18) ist der N-terminale, weniger amyloidogene IAPP-Sequenzbereich, der das kurze amyloidogene Peptidsegment IAPP(14–18) enthält.<sup>[21]</sup> IAPP(19–37) ist der hydrophobe und stark amyloidogene C-terminale Sequenzbereich, der die amyloidogenen Peptidsequenzen IAPP(22–27) und IAPP(30–37) enthält.<sup>[20,31]</sup> Sowohl IAPP(1–18) als auch IAPP(19–37) banden mit einer Affinität im nanomolaren Bereich an  $\text{A}\beta$ 40 (Tabelle 2, Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Anschließend wurden die beiden Peptidomänen systematisch verkürzt und Fluoreszenztitrati-



**Abbildung 4:** Vorgeschlagene Regionen für die Kreuz- und die Selbstwechselwirkung von Aβ40 und IAPP auf der Basis von Bindungsassays mit Peptidarrays (graue Balken; hellgrau: schwache Wechselwirkung) sowie Hot-Spot-Regionen (blaue Buchstaben) der Aβ40-IAPP-, Aβ40-Aβ40- und IAPP-IAPP-Wechselwirkungsdomänen, die mittels Fluoreszenztitrationsbindungsassays identifiziert wurden. Unterstreichungen unter den Sequenzen zeigen die kürzesten Peptidsegmente an, die noch in der Lage sind, Aβ40 oder IAPP zu binden. Dennoch sind die Bindungsaaffinitäten dieser kürzeren Segmente schwächer als diejenigen der identifizierten längeren Hot-Spot-Regionen.

**Tabelle 2:** Identifizierung der IAPP-Hot-Spot-Regionen (fett), die Vollängen-Aβ40 oder -IAPP binden, und Bestimmung von  $K_{d,app}$  mit Fluoreszenztitrationsbindungsassays.<sup>[a]</sup>

IAPP-Sequenz	$K_{d,app}$ (für Aβ40) <sup>[b,c]</sup>	$K_{d,app}$ (für IAPP) <sup>[b,c]</sup>
IAPP	48.5 nM ( $\pm 4.2$ ) <sup>[3]</sup>	9.7 ( $\pm 0.9$ ) <sup>[25]</sup>
IAPP(1–18)	183 nM ( $\pm 56$ )	125 nM ( $\pm 18$ )
<b>IAPP(8–18)</b>	275 nM ( $\pm 28$ )	233 nM ( $\pm 59$ )
IAPP(9–18)	1.0 $\mu$ M ( $\pm 0.1$ )	535 nM ( $\pm 6$ )
IAPP(10–18)	1.3 $\mu$ M ( $\pm 0.1$ )	569 nM ( $\pm 12$ )
IAPP(11–18)	–	–
IAPP(10–17)	–	–
IAPP(1–7)	–	–
IAPP(19–37)	281 nM ( $\pm 20$ )	374 nM ( $\pm 10$ )
IAPP(20–29)	322 nM ( $\pm 25$ )	293 nM ( $\pm 23$ )
IAPP(21–28)	587 nM	316 nM
<b>IAPP(22–28)</b>	363 nM ( $\pm 36$ )	398 nM ( $\pm 70$ )
IAPP(23–28)	–	795 nM
IAPP(24–28)	n.b.	–
IAPP(22–27)	–	1.2 $\mu$ M
IAPP(23–27)	n.b.	–
IAPP(22–26)	n.b.	–
IAPP(30–37)	–	–

[a] Die Titrationen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) und 1% HFIP durchgeführt, wobei die N<sup>α</sup>-aminoterminal fluoreszenzmarkierten IAPP-Sequenzen mit Aβ40 und IAPP titriert wurden.<sup>[3,25]</sup>

[b] Siehe Fußnote zu Tabelle 1. [c] –: keine Bindung bei Konzentrationen  $\leq 20 \mu$ M; n.b. = nicht bestimmt.

onsbindungsassays durchgeführt. Dabei wurden die Peptidsequenzen IAPP(8–18) und IAPP(22–28) als die kürzesten Sequenzen identifiziert, die noch in der Lage sind, Aβ40 mit Affinitäten im nanomolaren Bereich zu binden (Tabelle 2, Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass IAPP(10–18) zwar das kürzeste Erkennungselement in IAPP(1–18) ist, das für die Wechselwirkung mit Aβ40 benötigt wird, dass aber seine Affinität signifikant kleiner ist als die von IAPP(8–18), könnte sein, dass die Hot-Spot-Region von Aβ40, Aβ(27–32), an IAPP(8–18), nicht aber an IAPP(10–18) binden kann, wie

Untersuchungen der Kreuzwechselwirkungen ergaben (siehe Tabelle 3).

Da kürzlich vorgeschlagen wurde, dass IAPP(8–18) und IAPP(22–28) die Selbstassoziation von IAPP vermitteln, deuteten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die gleichen IAPP-Sequenzen auch an Heteroassoziationsprozessen beteiligt sind.<sup>[6,21,29]</sup> Daher untersuchten wir die Wechselwirkung der obigen IAPP-Sequenzen mit IAPP (Tabelle 2, Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Die Affinitäten aller IAPP-Peptidsequenzen für IAPP waren in der Tat sehr ähnlich denen für Aβ40. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4 zusammengefasst und belegen, dass IAPP(8–18) und IAPP(22–28) Hot-Spot-Regionen der IAPP-Aβ40- und IAPP-IAPP-Wechselwirkungsdomänen sind.

Um die Bindungsstellen der identifizierten Hot-Spot-Regionen innerhalb von Aβ40 und IAPP zu bestimmen, wurden nun die Kreuzwechselwirkungen zwischen ihnen oder leicht über sie hinaus verlängerten Peptidsequenzen untersucht (Tabelle 3, Tabellen 1 und 2 in den Hintergrundinformationen). Wie Abbildung 5 zu entnehmen ist,

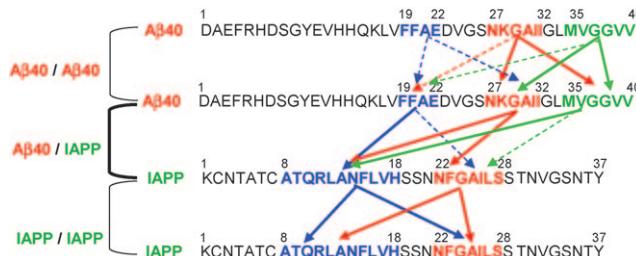
**Tabelle 3:** Mithilfe von Fluoreszenztitrationsbindungsassays ermittelte  $K_{d,app}$ -Werte für Kreuzwechselwirkungen zwischen den identifizierten Hot-Spot-Regionen innerhalb von Aβ40 und IAPP (fett) oder leicht über sie hinaus verlängerten Peptidsequenzen (mager).<sup>[a,b]</sup>

Aβ40-Sequenz	$K_{d,app}$		
	für IAPP(8–18)	für IAPP(22–28)	für IAPP(20–29)
<b>Aβ(19–22)<sup>[c]</sup></b>	2.9 $\mu$ M	– <sup>[e]</sup>	– <sup>[e]</sup>
Aβ(15–24) <sup>[d]</sup>	4.2 $\mu$ M	6.7 $\mu$ M	6.4 $\mu$ M
<b>Aβ(27–32)<sup>[c]</sup></b>	1.4 $\mu$ M	566 nM <sup>[f]</sup>	305 nM
Aβ(25–35) <sup>[d]</sup>	902 nM	426 nM	698 nM
<b>Aβ(35–40)<sup>[c]</sup></b>	1.1 $\mu$ M	– <sup>[e]</sup>	869 nM

[a] Die Titrationen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) und 1% HFIP durchgeführt. [b] Die  $K_{d,app}$ -Werte wurden aus einer Bindungskurve bestimmt. [c] Die N<sup>α</sup>-aminoterminal fluoresceinmarkierten Aβ40-Segmente wurden mit den IAPP-Segmenten titriert.<sup>[3,25]</sup> [d] Die N<sup>α</sup>-aminoterminal fluoresceinmarkierten IAPP-Segmente wurden mit den Aβ40-Segmenten titriert.<sup>[3,25]</sup> [e] –: keine Bindung bei Konzentrationen  $\leq 20 \mu$ M. [f]  $K_{d,app}$  der Wechselwirkung Aβ(27–32)-IAPP(21–28) (keine Bindung mit IAPP(22–28)).

wurde ein ausgedehntes Netzwerk an Selbst- und Kreuzwechselwirkungen im nano- bis niedrig mikromolaren Bereich aufgedeckt. Daraus ließ sich schließen, dass an den Selbst- und Heteroassoziationsprozessen von Aβ40 und IAPP starke kooperative Wechselwirkungen zwischen den gleichen Bindungsstellen beteiligt sind. Die Richtigkeit der Ergebnisse unserer Untersuchungen konnte darüber hinaus mithilfe von Kontrollexperimenten bestätigt werden (siehe Text und Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen).

Man nimmt an, dass die Selbstassoziation von Aβ42 eine äußerst wichtige Rolle bei der AD-Pathogenese spielt.<sup>[32]</sup> Aus diesem Grund gingen wir auch der Frage nach, ob Aβ42 mit IAPP und IAPP-GI in ähnlicher Weise wie Aβ40 interagiert.<sup>[3]</sup> Unsere Befunde lassen in der Tat den Schluss zu, dass Aβ42 ähnlich wie Aβ40 mit IAPP und IAPP-GI wechselwirkt, dass die Aβ42-IAPP-Wechselwirkung die zelltoxische Oligomerisierung und Amyloidbildung beider Polypeptide unterdrückt und dass diese Wechselwirkung durch die glei-



**Abbildung 5.** Zusammenfassung der identifizierten Kreuz- und Selbstwechselwirkungen zwischen den Hot-Spot-Regionen (durchgezogene Pfeile) oder den leicht verlängerten Sequenzen (gestrichelte Pfeile) der A $\beta$ 40-IAPP-Wechselwirkungsdomäne (Hot-Spot-Regionen in blau, rot und grün; siehe Tabelle 3 und die Tabellen 1 und 2 in den Hintergrundinformationen). Für die Wechselwirkungen zwischen längeren Regionen wurden folgende Sequenzen verwendet: A $\beta$ (15–24) statt A $\beta$ (19–22), A $\beta$ (25–35) statt A $\beta$ (27–32) und IAPP(20–29) statt IAPP(22–28).

chen Hot-Spot-Regionen wie die A $\beta$ 40-IAPP-Wechselwirkung vermittelt wird (Abbildungen S4–S6 sowie Tabellen 3 und 4 in den Hintergrundinformationen).<sup>[3]</sup> Von Bedeutung ist auch der Befund, dass die A $\beta$ 42-IAPP-GI-Wechselwirkung die Bildung zelltoxischer Spezies und Amyloidfibrillen durch A $\beta$ 42 inhibieren kann, wie es kürzlich auch für die A $\beta$ 40-IAPP-GI-Wechselwirkung nachgewiesen wurde (Abbildungen S4–S6 in den Hintergrundinformationen).<sup>[3]</sup>

Wir konnten somit zeigen, dass die hochaffinen Kreuz-Amyloidwechselwirkungen zwischen A $\beta$  und IAPP, die der Heteroassoziation der beiden Polypeptide zugrundeliegen, zwischen ihren Amyloid-Selbsterkennungsregionen stattfinden. Unsere Befunde weisen auch darauf hin, dass die – wahrscheinlich konkurrierenden – Hetero- und Selbstassoziationsprozesse von A $\beta$  und IAPP mittels eines flexiblen und breiten Netzwerks aus hochaffinen, multiplen und kooperativen intra- und intermolekularen Selbst- und Kreuzwechselwirkungen zwischen den identifizierten Hot-Spot-Regionen ablaufen. Die ausgeprägte konformative Flexibilität der A $\beta$ - und IAPP-Monomere würde solche Wechselwirkungen in der Tat begünstigen.<sup>[16]</sup> Das identifizierte ausgedehnte Kreuzwechselwirkungsnetzwerk würde die hohen Affinitäten der Selbst- und Kreuzwechselwirkungen von A $\beta$  und IAPP erklären. Außerdem würde dieses Netzwerk die Bildung polymorpher supramolekularer Strukturen, einschließlich Hetero- und Homoassoziaten, ermöglichen. Ein solches Netzwerk ist in Einklang mit Strukturmodellen von A $\beta$ - und IAPP-Amyloidfibrillen und mit ihrem Polymorphismus, wobei detaillierte Informationen zu den Strukturen von A $\beta$ -IAPP-Heteroaggregaten bisher noch nicht vorliegen.<sup>[6,18,19,22,23,33,34]</sup>

Frühere Untersuchungen haben kurze Peptidsequenzen mit hohem  $\beta$ -Faltblattbildungs- und amyloidogenem Potential identifiziert.<sup>[20,28,30]</sup> Solche Sequenzen können einer Polypeptidsequenz Amyloidogenität verleihen.<sup>[35]</sup> Unsere Ergebnisse und jüngste Befunde anderer stützen die Hypothese, dass, zusätzlich zu solchen Amyloidmotiven, auch Kreuz-Amyloiderkennungsmotive existieren, die möglicherweise sehr ähnlich oder identisch zu den Amyloidmotiven sind.<sup>[5–7]</sup> Die beiden Peptidsegmente IAPP(8–18) und IAPP(22–28), welche die IAPP-Heteroassoziation mit A $\beta$  vermitteln,

führen z.B. auch die Selbstassoziation von IAPP zu Amyloidfibrillen herbei; darüber hinaus sollen sie die IAPP-Heteroassoziation mit Insulin vermitteln.<sup>[5,6,21,22,29]</sup> Außerdem haben sich die hier identifizierten IAPP-bindenden Sequenzen A $\beta$ (27–32) und A $\beta$ (35–40(42)) auch als Kernregionen der A $\beta$ -Tau-Wechselwirkung erwiesen.<sup>[7]</sup>

Unsere Untersuchungen haben zur Identifizierung von fünf kurzen Peptidsegmenten von A $\beta$  und IAPP als Hot-Spot-Regionen der A $\beta$ -IAPP-Kreuzwechselwirkungsdomäne geführt und gezeigt, dass diese Peptide in der Lage sind, Selbst- und Kreuzwechselwirkungen einzugehen, und dass sie hochaffine Liganden von sowohl A $\beta$  als auch IAPP sind. Unsere Befunde deuten darauf hin, dass die molekularen Erkennungsmotive, die der Amyloid-Selbstassoziation von A $\beta$ , IAPP und möglicherweise anderen amyloidogenen Polypeptiden zugrundeliegen, auch die Amyloid-Heteroassoziation vermitteln. Die Ergebnisse bieten somit eine neue molekulare Grundlage für die Aufklärung der Wechselwirkungen, die an der amyloidogenen und zelltoxischen Proteinselfassoziation bei AD und T2D und möglicherweise bei anderen Proteinaggregationskrankheiten beteiligt sind, und sollten zum Design von Molekülen beitragen, die diese Prozesse blockieren.

Eingegangen am 1. September 2009,  
veränderte Fassung am 25. Dezember 2009  
Online veröffentlicht am 22. März 2010

**Stichwörter:**  $\beta$ -Amyloidpeptid · Inselamyloid-Polypeptide · Molekulare Erkennung · Proteinselfassoziation · Proteinwechselwirkungen

- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
- [2] P. Westermark, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5942–5949.
- [3] L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1268–1274; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1246–1252.
- [4] A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7222–7227; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7114–7118.
- [5] S. Gilead, H. Wolfson, E. Gazit, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6626–6630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6476–6480.
- [6] J. J. Wiltzius, S. A. Sievers, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1521–1530.
- [7] J. P. Guo, T. Arai, J. Miklossy, P. L. McGeer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1953–1958.
- [8] J. Laurén, D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert, S. M. Strittmatter, *Nature* **2009**, *457*, 1128–1132.
- [9] P. Westermark, Z.-C. Li, G. Westermark, A. Leckström, D. Steiner, *FEBS Lett.* **1996**, *379*, 203–206.
- [10] B. O’Nuallain, A. D. Williams, P. Westermark, R. Wetzel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17490–17499.
- [11] B. I. Giasson, M. S. Forman, M. Higuchi, L. I. Golbe, C. L. Graves, P. T. Kotzbauer, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *Science* **2003**, *300*, 636–640.
- [12] J. N. Buxbaum, Z. Ye, N. Reixach, L. Friske, C. Levy, P. Das, T. Golde, E. Masliah, A. R. Roberts, T. Bartfai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2681–2686.
- [13] M. R. Nicolls, *Curr. Alzheimer Res.* **2004**, *1*, 47–54.
- [14] L. Li, C. Hölscher, *Brain Res. Rev.* **2007**, *56*, 384–402.
- [15] J. Miklossy, H. Qing, A. Radenovic, A. Kis, B. Vileno, F. Laszlo, L. Miller, R. N. Martins, G. Waeber, V. Mooser, F. Bosman, K.

- Khalili, N. Darbinian, P. L. McGeer, *Neurobiol. Aging* **2008**, DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.019.
- [16] V. N. Uversky, A. L. Fink, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2004**, *1698*, 131–153.
- [17] A. Kapurniotu, *Biopolymers* **2001**, *60*, 438–459.
- [18] S. Luca, W. M. Yau, R. Leapman, R. Tycko, *Biochemistry* **2007**, *46*, 13505–13522.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Y. Mazor, S. Gilead, I. Benhar, E. Gazit, *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 1013–1024.
- [22] S. H. Shim, R. Gupta, Y. L. Ling, D. B. Strasfeld, D. P. Raleigh, M. T. Zanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6614–6619.
- [23] T. Luhrs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Lohr, B. Bohrmann, H. Dobeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17342–17347.
- [24] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217–9232.
- [25] L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2046–2051.
- [26] R. Wetzel, S. Shivaprasad, A. D. Williams, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1–10.
- [27] L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindquist, J. Johanson, A. Karlström, J. Thyberg, J. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8545–8548.
- [28] M. Lopez de La Paz, L. Serrano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 87–92.
- [29] R. Mishra, M. Geyer, R. Winter, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1769–1772.
- [30] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riek, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, *447*, 453–457.
- [31] M. R. Nilsson, D. P. Raleigh, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1375–1385.
- [32] M. A. Findeis, *Pharmacol. Ther.* **2007**, *116*, 266–286.
- [33] C. S. Goldsbury, G. J. S. Cooper, K. N. Goldie, S. A. Müller, E. L. Saafi, W. T. M. Gruijters, M. P. Misur, A. Engel, U. Aebi, J. Kistler, *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 12–27.
- [34] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W.-M. Yau, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18349–18354.
- [35] A. Esteras-Chopo, L. Serrano, M. Lopez de La Paz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16672–16677.