ETH zürich

ETH Library

Liposomal models to study lipid membrane-related diseases

Doctoral Thesis

Author(s):
Marenchino, Marco

Publication date:
2006

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-005362677

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH No. 16711

Liposomal models to study lipid membrane-related diseases

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

MARCO MARENCHINO

Laureato in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, University of Torino

born November 6, 1974

citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Heidi Wunderli-Allenspach, examiner
Dr. Stefanie D. Krämer, co-examiner
Prof. Dr. Bernard Testa, co-examiner
Prof. Dr. Beat H. Meier, co-examiner

Zürich, 2006

Abstract

Biological membranes are essential for cell homeostasis. Their lipid composition is important for their structure and functions. Alterations in the organization of lipids, which may occur during drug therapy or aging, can play a role in many diseases. In this thesis, we employ liposomes as model artificial membranes to investigate the contribution of lipids to membrane-related diseases.

Phopholipidosis is a lipid storage disorder caused by cationic amphiphilic drugs characterized by the lysosomal accumulation of phospholipids and drug. α-Tocopherol has a reversible effect on phospholipidosis in rats and cell culture. We studied the influence of α-tocopherol on the partitioning of the phospholipidosis-inducing drug desipramine in a liposome/buffer system using equilibrium dialysis with the following lipid compositions: egg phosphatidylcholine or wheat germ phosphatidylinositol or a combination of phosphatidylcholine, phosphatidylinositol and cholesterol, containing between 1.5 and 20% (mol per mol total lipids) of α-tocopherol, α-tocopherol acetate, or 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol. α-Tocopherol (1.5%) enhanced the partition coefficient of neutral desipramine by up to 1.1 log units while it had no influence on the partitioning of the ionized compound. In the phosphatidylcholine liposome system, at pH 7.4 log*D* increased with increasing α-tocopherol concentrations but was unchanged at pH 4.5. Similar effects were found with pentamethyl-6-chromanol while α-tocopherol acetate or cholesterol, between 1.5 and 20%, had no influence on the partitioning of desipramine. From these results we postulate that *in vivo* α-tocopherol could mediate a redistribution of amphiphilic drugs from lysosomal membranes (pH ~ 4.5) to membranes and lipoproteins at pH 7.

Alzheimer's disease represents a severe membrane-related pathology involving a membrane-bound substrate metabolized by integral membrane proteases. In the non-amyloidogenic processing pathway the Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) is proteolytically cleaved by the α-secretase. According to the structure of APP, the α-cleavage occurs at the extra-cellular domain of APP, close to the membrane surface. The

accessibility and the motional properties of the α-cleavage site of APP were studied in a liposomal model system as a function of the bilayer composition. Synthetic as well as natural phospholipids were employed to prepare vesicles with different physicochemical properties. The α-proteolytic processing was simulated by the tryptic digestion of $APP_{684-726}$, a synthetic fragment of APP, upon reconstitution in lipid vesicles. The enzymatic cleavage of the ectodomain of $APP_{684-726}$ was characterized in terms of Michaelis-Menten parameters. We found that the lipid bilayers influenced the accessibility of trypsin for its substrate, but the uncertainty of the measured kinetic parameters did not allow addressing the effects of particular lipids. To elucidate the molecular events that may determine the α-processing of APP, we have exploited solid state NMR and circular dichroism spectroscopy to gain insight into the dynamics and the topology of $APP_{684-726}$ reconstituted in lipid membranes. The proper reconstitution of the peptide was confirmed by ^{2}H-NMR spectra of the ^{2}H labelled Ala_{713}: comparison of the observed anisotropy suggests that $APP_{684-726}$ adopts a α-helical conformation within the tested bilayers. Moreover, CD spectra are corroborative of a partial α-helical structure adopted by $APP_{684-726}$ within the membrane. ^{15}N-NMR spectra of the ^{15}N labelled Ala_{692}, which is in between the α-cleavage site and the putative transmembrane domain, showed a lipid-specific scaling of the chemical shielding anisotropy, suggesting that the accessibility of the site for proteolytic cleavage could be controlled by the characteristics of the lipid bilayer.

Riassunto

L'organizzazione e la struttura delle membrane cellulari sono importanti ai fini di un corretto funzionamento della cellula. Tuttavia, alterazioni nell'organizzazione dei lipidi di membrana possono conseguire a terapie farmacologiche o a processi di invecchiamento. Attraverso l'impiego di liposomi, in questa tesi studiamo il ruolo dei lipidi nello sviluppo di malattie in cui sono coinvolte le membrane cellulari.

Il termine fosfolipidosi descrive una condizione associata ad un eccessivo accumulo di fosfolipidi nel citoplasma cellulare, causato da un alterato catabolismo lisosomiale dei fosfolipidi stessi. Molti composti, in particolare composti cationici anfifilici, hanno la propensione a causare fosfolipidosi come un non desiderato, ma abbastanza frequente, effetto collaterale osservato in studi di farmacologia. L'α-tocoferolo è stato dimostrato svolgere un effetto reversibile per la fosfolipidosi in ratti e culture cellulari. Abbiamo studiato l'influenza dell'α-tocoferolo sull'affinità di membrana della desipramina, un antidepressivo noto indurre fosfolipidosi, mediante l'uso di liposomi e con la tecnica della dialisi all'equilibrio. Le seguenti composizioni di membrana sono state prese in considerazione: fosfatidilcolina di uovo, fosfatidilinositolo e colesterolo, conteneti concentrazioni molari variabili tra il 1.5% ed il 20% di α-tocoferolo, α-tocoferolo acetato o 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanolo. L'α-tocoferolo già alla concentrazione minima di 1.5% aumenta l'affinità di membrana della forma neutra della desipramina fino ad un ordine logaritmico di unità mentre non ha effetto sul coefficiente di ripartizione della forma ionizzata. In liposomi costituiti da fosfatidilcolina, il coefficiente di distribuzione aumenta con l'aumentare della concentrazione di membrana dell'α-tocoferolo a pH 7.4 ma non a pH 4.5. Un simile effetto è stato rilevato con il pentametil-6-cromanolo, mentre l'α-tocoferolo acetato ed il colesterolo, nell'intervallo di concentrazione tra l'1.5 ed il 20%, non hanno avuto alcuna influenza sulla ripartizione della desipramina. Sulla base di questi risultati, abbiamo ipotizzato che in vivo l'α-tocoferolo potrebbe determinare una redistribuzione dei farmaci anfifilici dalle membrane lisosomiali (pH 4.5) verso membrane e lipoproteine a pH fisiologico.

L'accumulo e l'aggregazione dei peptidi beta-amiloide (Aβ) è ritenuto essere responsabile della neurodegenerazione osservata in corso di Alzheimer. Tali peptidi derivano dalla proteolisi della proteina precursore dell'amiloide (APP). Nel corso della proteolisi non amiloidogenica, APP viene metabolizzato da una proteasi di membrana nota come α-secretasi. Secondo la struttura di APP, il sito di taglio dell'α-secretasi è localizzato nella sua sequenza extramembrana ed in vicinità della superficie cellulare. L'accessibilità e le proprietà dinamiche del sito di taglio dell'α-secretasi sono state studiate in modelli liposomiali di membrana in funzione della composizione lipidica. Fosfolipidi sia di origine sintetica che naturale sono stati impiegati per preparare membrane con differenti proprietà chimico-fisiche. L'attività proteolitica dell'α-secretasi è stata mimata attraverso la digestione con tripsina del peptide sintetico $APP_{684-726}$, analogo di APP, precedentemente incorporato in liposomi. L'attività proteolitica della tripsina è stata caratterizzata attraverso le costanti cinetiche di Michaelis-Menten. La presenza di una membrane lipidica influenza l'accessibilità della tripsina per il proprio substrao. Tuttavia, l'incertezza sulle misure effettuate non permette di attribuire tale fenomeno alle caratteristiche di lipidi specifici. Allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari che determinano l'α-proteolisi di APP, le dinamiche e la topologia di $APP_{684-726}$ incorporato in membrane lipidiche sono stati effettuati per mezzo del dicroismo circolare e dell'NMR in fase solida. La corretta ricostituzione del peptide in membrane è stata confermata dagli spettri NMR del deuterio: dal confronto delle anisotropie osservate, $APP_{684-726}$ sembra adottare una parziale conformazione ad α-elica. Tale osservazione è stata confermata dagli spettri di dicroismo circolare. Spettri ^{15}N-NMR del residuo marcato alanina, localizzata nella sequenza extramembrana in prossimità del sito di proteolisi dell'α-secetasi, hanno evidenziato una riduzione della costante di shielding suggerendo che l'accessibilità dell'α-secretasi per il proprio sito di taglio sull'APP possa essere controllato dalle caratteristiche della membrana stessa.