

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Modellpeptide zum Studium von β -Faltblattstrukturen

2.1.1. Design und Synthese wasserlöslicher, β -faltblattstrukturierter Peptide

Ziel des Designs der in dieser Arbeit vorgestellten Peptidmodelle war es, einfache und gut synthetisierbare Sequenzen zu entwerfen, die stabile intermolekular assoziierende β -Faltblattstrukturen ausbilden und dennoch wasserlöslich sind. Die Modellpeptide (Tabelle 3) bestehen aus einer zentralen, amphipathischen Valin-Threonin (VT)-Strukturdomäne (Krause *et al.*, 1996). Beide Aminosäuren weisen entsprechend der verschiedenen *propensity scales* eine hohe intrinsische Neigung auf, β -Faltblattstrukturen zu bilden (Chou & Fasman, 1974 und 1978; Minor & Kim, 1994a und 1994b; Smith *et al.*, 1994). Die wiederholende Anordnung im hydrophob-hydrophilen Muster entspricht der Periodizität von amphipathischen β -Strängen (Xiong *et al.*, 1995), wodurch die Ausbildung stabiler β -Faltblattstrukturen erreicht wird. Um den Einfluß der Sequenzlänge auf die Strukturstabilisierung und das Assoziationsverhalten untersuchen zu können, wurde die zentrale Domäne in ihrer Länge von drei bis zu acht VT-Paaren (6-16 Aminosäuren) variiert. Die nachfolgende Bezeichnung der einzelnen Peptide mit VT3 bis VT8 bezieht sich auf die Anzahl an VT-Paaren. Die Wasserlöslichkeit der Peptide wird von zwei, die VT-Strukturdomäne einrahmenden, Oktapeptidsequenzen, die jedoch selbst nicht an der Strukturierung beteiligt sein sollen, vermittelt. Dabei wurden Lysin und Asparaginsäure aufgrund ihres hydrophilen Charakters (Fauchere *et al.*, 1988; Johnsson *et al.*, 1989), sowie Prolin und Glycin wegen ihrer strukturbrechenden Eigenschaften ausgewählt (Chou & Fasman, 1974; O'Neil & DeGrado, 1990; Merutka *et al.*, 1990; Chakrabartty *et al.*, 1994).

Die Peptide wurden mittels automatischer Festphasensynthese nach Merrifield (1963) und Fmoc-Strategie (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) (Chang & Meienhofer, 1978) auf der Grundlage von Standardprotokollen synthetisiert. Hierbei wird das Peptid an einem polymeren Träger sequentiell vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Zunächst wird die C-terminale Aminosäure mit ihrer Carboxygruppe über eine Ankergruppierung mit dem polymeren Träger verbunden. Die in der Sequenz folgende, N-terminal Fmoc-geschützte Aminosäure wird am Carboxyterminus über Kupplungsreagentien (wie z.B. HBTU, N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]-N-methylmethaminium hexafluorophosphat N-

Tabelle 3. Synthetische (VT)_n-Peptide

(VT) _n -Peptide	Sequenz	Aminosäuren in der β-Faltblattstruktur- Domäne
VT3 n = 3	DPKGDPKGV VTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	6
VT4 n = 4	DPKGDPKGV VTVTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	8
VT5 n = 5	DPKGDPKGV VTVTVTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	10
VT6 n = 6	DPKGDPKGV VTVTVTVTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	12
VT7 n = 7	DPKGDPKGV VTVTVTVTVTVTVT . . GKGDPKPD-NH ₂	14
VT8 n = 8	DPKGDPKGV VTVTVTVTVTVTVTVTVT GKGDPKPD-NH ₂	16

oxid) aktiviert und dann an das freie Aminoende der Peptidkette gekuppelt. Um den Anteil an Fehlsequenzen in der VT-Domäne zu verringern, wurde im Doppelkupplungsmodus gearbeitet. Nach der Abspaltung des Peptides vom Harz, bei der gleichzeitig die Seitenkettenschutzgruppen mit entfernt werden, erfolgt die chromatographische Aufreinigung des Rohpeptides an einer *reversed-phase* (RP, Umkehrphase) Chromatographiesäule über Gradiententrennung. Als Standardsystem wird dabei Acetonitril (ACN)/Wasser-0,1% Trifluoressigsäure (TFA) verwendet. Schwierigkeiten bereitete die Aufreinigung der länger-kettigen Peptide VT7 und VT8, da es aufgrund des ausgeprägten Assoziationsverhaltens dieser Peptide in Gegenwart der hydrophoben Grenzfläche der RP-Säule zu einer extremen Peakverbreiterung kam. Die chromatographische Reinigung wurde deshalb unter erhöhter Temperatur bei 85°C und anschließender Kontrolle der Fraktionen über MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation Massenspektrometrie) durchgeführt.

2.1.2. Konformation

2.1.2.1. Circular-dichroismus- und Fourier Transformierte Infrarot-Spektroskopie

Circular-dichroismus (CD)- und Fourier Transformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie werden üblicherweise für die Sekundärstrukturanalyse von Peptiden und Proteinen eingesetzt.

CD wird bei der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen beobachtet. Er beschreibt die unterschiedliche Absorption von links und rechts circular polarisiertem Licht. Die resultierende elliptische Polarisation des Lichtes, die Elliptizität (Θ),

ist das Maß der Absorptionsdifferenz. Bei Peptiden und Proteinen wird der CD durch asymmetrische Elemente im Bereich des Peptidrückgrates und von aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Die Peptidbindung stellt zusammen mit dem benachbarten C_{α} -Atom einen optisch aktiven Chromophor dar. Das Zusammenwirken aller Peptidchromophore, das entscheidend von der Konformation des Peptidrückgrates bestimmt wird, führt letztendlich zu einem spezifischen, von der Sekundärstruktur der Peptide/Proteine abhängigen Verlauf des CD-Spektrums (Abb. 7). Die Elliptizität wird hierbei und auch nachfolgend im Text als molarer Wert pro Aminosäurerest angegeben.

Die für die jeweilige Sekundärstruktur typischen CD-Spektren sind durch folgende Merkmale charakterisiert:

- * β -Faltblattstrukturen: Minimum bei 215 ± 5 nm, Maximum bei 195-200 nm;
- * α -Helices: Doppelminimum bei 208-210 nm und 222 nm, Maximum bei 191-193 nm;
- * ungeordnete Strukturen: Minimum bei 195 nm, schwaches Maximum um 220 nm.

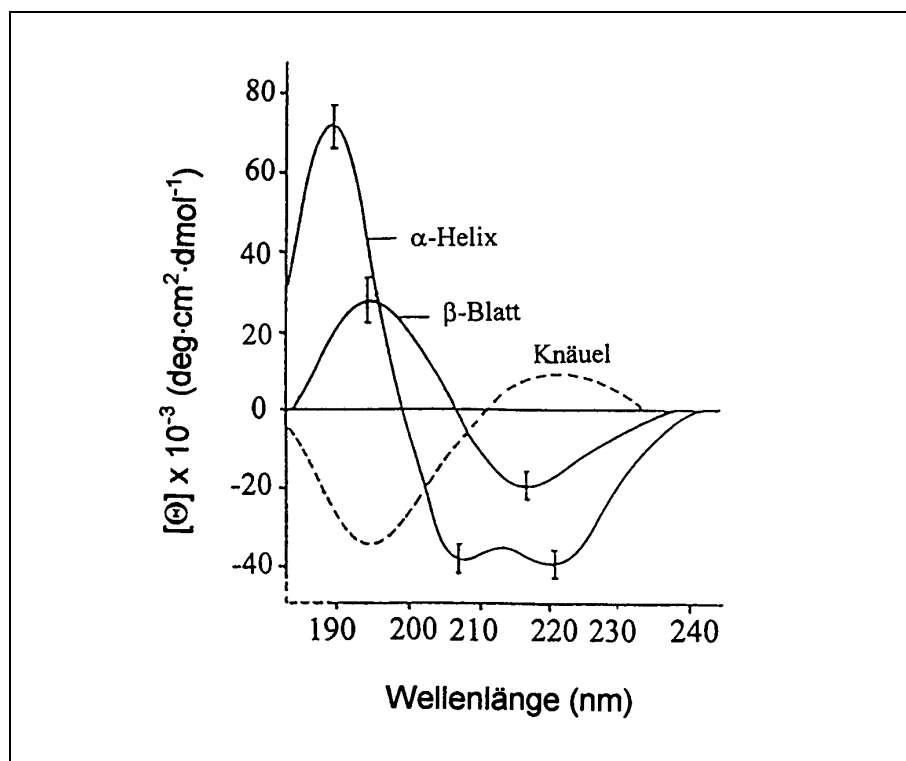


Abb. 7. CD-Spektren von Poly-L-lysin unter Bedingungen, bei denen die Polypeptidkette unterschiedliche Konformationen einnimmt (entnommen aus Holzhauser, S. 115, 1996).

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen mittels *FTIR-Spektroskopie* werden hauptsächlich die infrarotaktiven Schwingungen der Peptidbindung im Bereich der Amid-I- und Amid-II-Bande ($1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) genutzt (Abb. 8). Die Amid-I-Bande resultiert aus der Streckschwingung der C=O-Gruppe. Diese ist schwach gekoppelt mit einer in der Bindungsebene erfolgenden N-H-Beugeschwingung und einer C-N-Streckschwingung. Die Amid-II-Bande rührt von der N-H-Beugeschwingung und C-N-Streckschwingung her. Die Frequenz der Amid-I- und Amid-II-Bande variiert mit der Art der Wasserstoffbrückenbindungen, an denen die C=O- und N-H-Gruppen beteiligt sind. Sie können daher zur Identifikation der Sekundärstruktur herangezogen werden. Die Sekundärstrukturelemente im Amid-I-Bereich sind durch folgende Bandenpositionen (in D_2O) charakterisiert:

- * β -Faltblattstrukturen: $1620\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$ und 1690 cm^{-1}
- * α -Helices: $1648\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$
- * ungeordnete Strukturen: um 1644 cm^{-1}

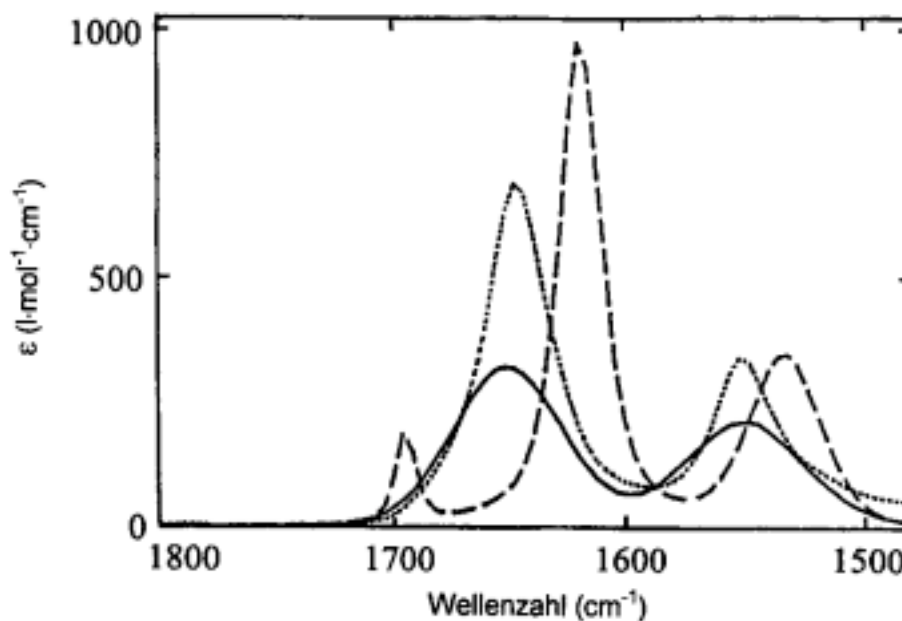


Abb. 8. Gemittelte FTIR-Spektren von Modellpeptiden für β -Faltblattstrukturen (---), α -Helices (.....) und ungeordnete Strukturen (—) (entnommen aus Holzhauser, S. 145, 1996)

2.1.2.2. Einfluß der Länge der VT-Domäne

Über CD-Untersuchungen in wäßriger Lösung wurde die unterschiedliche Fähigkeit der $(VT)_n$ -Peptide zur Ausbildung intermolekularer β -Faltblattstrukturen nachgewiesen. Kurze Peptide mit sechs und acht Aminosäuren in der zentralen Domäne (VT3 und VT4) sind unstrukturiert (Abb. 9 A, Spektren a und b). Ihre Spektren zeigen den für ungeordnete Strukturen typischen Verlauf, mit einem Minimum der molaren Elliptizität bei 198 nm. Durch Hinzufügen von zwei weiteren Aminosäuren (VT5) wird der Übergang in die β -Faltblattstruktur ausgelöst, was anhand der Rotverschiebung der Bande deutlich wird (Abb. 9 A, Spektrum c). Mit Verlängerung der VT-Domäne auf 12-16 Aminosäuren (VT6-VT8) ist dieser Übergang abgeschlossen (Abb. 9 A, Spektren d-f). Die CD-Spektren dieser Peptide sind typisch für β -Faltblattstrukturen mit einer negativen Bande bei 214 nm und einer

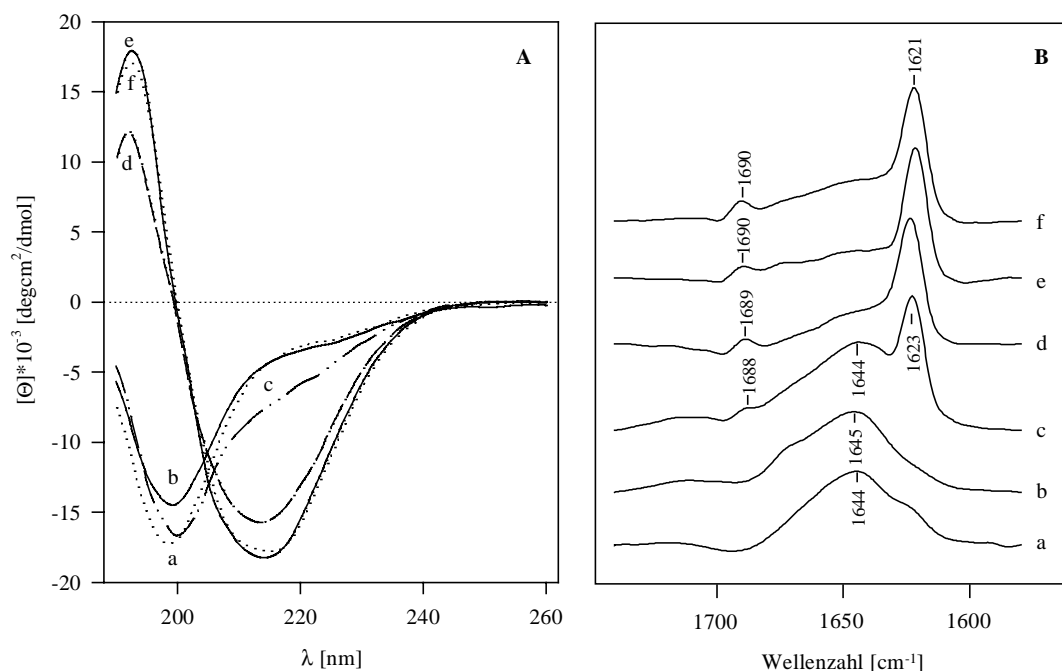


Abb. 9. Untersuchung der konformationellen Eigenschaften von $(VT)_n$ -Peptiden, $n=3-8$ [(a) VT3, (b) VT4, (c) VT5, (d) VT6, (e) VT7, (f) VT8] in Abhängigkeit von der Länge der VT-Domäne. (A) CD-Spektren in Wasser bei einer Peptidkonzentration von 5×10^{-5} M; (B) FTIR-Spektren in der Amid-I-Region nach Fourier-Dekonvolution in D_2O -Puffer (30 mM Natriumphosphat, pH 2.2) bei einer Peptidkonzentration von 5×10^{-4} M.

positiven Bande bei 192 nm. Die steigenden Intensitäten der molaren Elliptizität in den CD-Spektren vom VT6 zu den Peptiden VT7 und VT8 verdeutlichen, daß die Stabilität der β -Faltblattstruktur durch die Verlängerung der VT-Region weiter erhöht werden kann. Durchschnittliche Werte der molaren Elliptizität von $(-10 \pm 2) \times 10^3 \text{ deg cm}^2/\text{dmol}$ bei $215 \pm 5 \text{ nm}$ sind typisch für monomere oder niedermolekulare β -Faltblattstrukturen. Dementsprechend liefern die hohen Werte der molaren Elliptizität von -16×10^3 und $-18 \times 10^3 \text{ deg cm}^2/\text{dmol}$ für die Peptide VT6 und VT7/VT8 bei 214 nm einen Hinweis auf hochassoziierte β -Faltblattstrukturen.

Untersuchungen zum Einfluß des pH-Wertes (2,4, 4,4 und 7,4) auf die Konformation der $(\text{VT})_n$ -Peptide zeigten keine Veränderungen im Verlauf der CD-Spektren.

Daß der Übergang von einem unstrukturierten (VT5) in einen geordneten, β -faltblattstrukturierten Zustand (VT6) durch den Einbau von nur einem VT-Paar ausgelöst wird, konnte über FTIR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 9 B). Die gefundene kritische Kettenlänge von 12 Aminosäuren zur Ausbildung stabiler β -Faltblattstrukturen ist damit deutlich höher als die in früheren Studien an Valin-Threonin-Peptiden bestimmte Länge von sechs Aminosäuren (entsprechend 3 VT-Paare) (Altmann *et al.*, 1986). Dieser Anstieg kann durch eine verbesserte Löslichkeit der Peptide aufgrund der terminalen Oktapeptidsequenzen erklärt werden. Die FTIR-Spektren der Peptide VT3 und VT4 (Abb. 9 B, Spektren a und b) sind durch eine breite, strukturlose Amid-I-Bande bei $1644\text{--}1645 \text{ cm}^{-1}$, die typisch für ungeordnete Strukturen ist, charakterisiert. Das Spektrum des Peptides VT5 (Abb. 9 B, Spektrum c) enthält zwei weitere Banden, eine intensive bei 1623 cm^{-1} und eine dazu vergleichsweise schwache bei 1688 cm^{-1} . Die Aufspaltung der Amid-I-Absorption in eine nieder- und hochfrequente Bande ist typisch für antiparallele β -Faltblattstrukturen (Krimm & Bandekar, 1986). Sie resultiert aus der Kopplung der Übergangsdipole. Die für β -Faltblattstrukturen charakteristische Amid-I-Absorption dominiert das Erscheinungsbild der Spektren der Peptide VT6, VT7 und VT8 (Abb. 9 B, Spektren d-f). Der wachsende Abstand zwischen den beiden β -Banden (65 cm^{-1} : VT5 \rightarrow 69 cm^{-1} : VT8) verdeutlicht einen Gewinn an Strukturstabilität. Er resultiert aus der Stärkung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den β -Strängen aufgrund der Verlängerung der VT-Region.

2.1.2.3. Stabilität der gebildeten β -Faltblattstrukturen

Um die Stabilität der gebildeten β -Faltblattstrukturen zu untersuchen, wurden Guanidiniumhydrochlorid- und Temperatur-Denaturierungsexperimente mit den Peptiden VT6, VT7 und VT8 durchgeführt. Zur Detektion konformationeller Veränderungen wurden CD-Spektren aufgenommen.

Durch den Zusatz von Guanidiniumhydrochlorid bis zu einer Konzentration von 7,2 M bei einer Peptidkonzentration von 5×10^{-5} M konnten keine Veränderungen in den CD-Spektren festgestellt werden, d.h. die Stabilität der gebildeten β -Faltblattstrukturen konnte nicht beeinträchtigt werden.

Eine Temperaturerhöhung von 25°C auf 85°C hatte keinen signifikanten Einfluß auf die CD-Spektren der Peptide (5×10^{-5} M in Wasser), was ebenfalls für eine hohe Stabilität der gebildeten β -Faltblattstruktur spricht.

2.1.2.4. Einfluß strukturinduzierender Lösungsmittel

Wie im Kapitel 1.2.1. erläutert, ist die Konformation von Peptiden sehr stark von den Umgebungsbedingungen abhängig. Es wurde daher der Einfluß strukturinduzierender Lösungsmittel auf die Konformation der (VT)_n-Peptide untersucht.

TFE fördert die Ausbildung α -helikaler Strukturen (Nelson & Kallenbach, 1986, 1989; Merutka & Stellwagen, 1989). Dabei fungiert es bevorzugt als ein Helixstabilisator, der in Sequenzen mit hoher α -helikaler Neigung die Ausbildung von α -Helices unterstützt, anstatt sie sequenzunabhängig in allen Peptiden/Proteinen zu induzieren (Lehrman *et al.*, 1990; Segawa *et al.*, 1991; Sönnichsen *et al.*, 1992). Im Vergleich zu Wasser ist TFE ein besserer Protonenakzeptor, aber schlechterer Donator. Wasser übt beide Funktionen gleichermaßen gut aus und stört daher die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken zwischen C=O- und N-H-Gruppen, die zur Helixstabilisierung erforderlich sind. Dagegen bindet TFE bevorzugt an die C=O-Gruppe, ohne dessen intramolekulare Wasserstoffbrücke zur N-H-Gruppe zu brechen (Rajan & Balaram, 1996). Die im Vergleich zum Wasser hydrophobere Lösungsumgebung begünstigt die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen.

Um den Effekt von TFE auf Peptide mit einer hohen Neigung zur β -Faltblattstruktur-Bildung zu untersuchen, wurden CD-Spektren der $(VT)_n$ -Peptide in 50% TFE/50% H_2O (v/v) aufgenommen (Abb. 10 A, B). Bei den in Wasser unstrukturierten Peptiden mit drei bis fünf VT-Paaren gelingt es mit wachsender Kettenlänge, den Übergang in eine α -helikale Konfor-

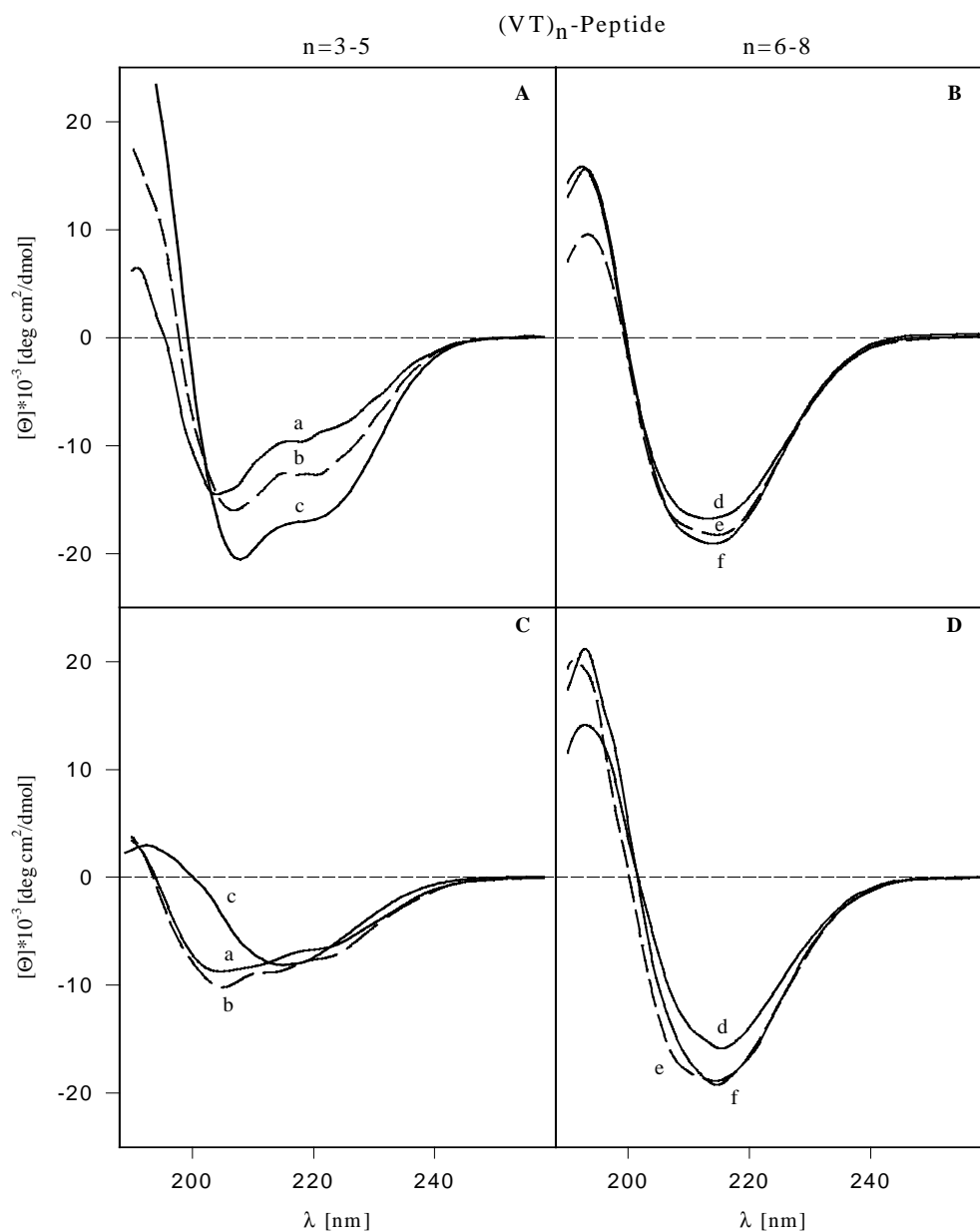


Abb. 10. Einfluß strukturinduzierender Lösungsmittel auf die Konformation von $(VT)_n$ -Peptiden. CD-Spektren von in Wasser konformationell flexiblen Peptiden, $n=3-5$ [(a) VT3, (b) VT4, (c) VT5] und Peptiden in stabilen β -Faltblattstrukturen, $n=6-8$ [(d) VT6, (e) VT7, (f) VT8] bei einer Peptidkonzentration von 5×10^{-5} M in (A, B) 50 % TFE und (C, D) 15 mM SDS.

mation zu induzieren, was durch die Herausbildung des Doppelminimums bei 208 und 222 nm angezeigt wird (Abb. 10 A). Dieses Ergebnis bestätigt andere Studien, wonach es möglich ist, auch in potentiell β -Faltblattstruktur-bildenden Peptiden α -Helices zu induzieren (Sönnichen *et al.*, 1992; Fabian *et al.*, 1993a; Liu *et al.*, 1994). Der sequentielle Übergang von fünf zu sechs VT-Paaren (10 \rightarrow 12 Aminosäuren) ist, wie auch schon im wäßrigen Milieu beobachtet, durch einen Qualitätssprung in den konformationellen Eigenschaften charakterisiert. Die Peptide VT6, VT7 und VT8 werden durch TFE nicht in ihrer β -Faltblattstruktur-Ausbildung beeinflusst (Abb. 10 B). Damit können andere Studien bestätigt werden, wonach Peptide in TFE nicht zwangsläufig α -helikal sein müssen, sondern auch stabile β -Faltblattstrukturen einnehmen können (Balcerski *et al.*, 1976; Kelly *et al.*, 1977; Narayanan *et al.*, 1986).

SDS erzeugt eine hydrophobe Lösungsumgebung. Bei höheren Konzentrationen (>8mM, in Wasser ohne Salzzusatz) bildet es Mizellen, die gewöhnlich als Stabilisator für α -Helices fungieren (Zhong & Johnsen, 1992; Waterhous & Johnsen, 1994). Die Studien an den (VT)_n-Peptiden zeigen jedoch, daß es mit mizellarem SDS möglich ist, das konformationell flexible Peptid mit fünf VT-Paaren in eine β -Faltblattstruktur zu überführen (Abb. 10 C) bzw. die β -Faltblattstrukturierung in den Peptiden mit mehr als sechs VT-Paaren zu stärken (Abb. 10 D). Letzteres wird anhand des leichten Anstieges der Intensitäten der molaren Elliptizität bei 214 und 195 nm im Vergleich zum wäßrigen Milieu deutlich (vgl. Abb. 9 A). Bei den kurzen Sequenzen (VT3 und VT4) vollzieht sich der konformationelle Übergang von einer ungeordneten Struktur in einen Zustand höherer Ordnung (Abb. 10 C). Die strukturinduzierende bzw. -stabilisierende Wirkung von mizellarem SDS kann dabei durch die Erzeugung einer hydrophil/hydrophoben Grenzfläche erklärt werden, die die Ausbildung von amphipathischen β -Faltblattstrukturen fördert (vgl. Abb. 5)

Die Untersuchungen in 50% TFE und mizellarem SDS haben gezeigt, daß strukturinduzierende Lösungsmittel die Ausbildung von Sekundärstrukturen in konformationell flexiblen Peptiden kontrollieren (VT3, VT4, VT5), während stabile β -Faltblattstrukturen (VT6, VT7, VT8) kaum beeinflusst werden. Es konnte festgestellt werden, daß TFE die intrinsische Neigung zur β -Faltblattstruktur-Ausbildung bei kurzen Peptidketten überschreibt und die Bildung von α -Helices fördert, während durch mizellares SDS β -Faltblattstrukturen stabilisiert werden.

2.1.2.5. Lokalisierung der β -Strukturdomäne

Die bisher beschriebenen Konformationsuntersuchungen haben eine sehr gute Korrelation zwischen der β -Faltblattstrukturierung und der Länge der VT-Domäne aufgezeigt. Zur Bestätigung, daß sich die entworfene β -Faltblattstrukturdomäne tatsächlich über die VT-Region erstreckt, wurden Untersuchungen zur Strukturlokalisierung durchgeführt. Aufgrund der hohen Assoziationsstendenz der Peptide, die sich schon in den CD-Spektren (Abb. 9 A, Spektren d-f) durch die hohen Werte der molaren Elliptizität bei 214 nm angedeutet hatte, und auch später über Assoziationsuntersuchungen nachgewiesen werden konnte (vgl. 2.1.3.), waren NMR-Untersuchungen zur Strukturlokalisierung nicht möglich. Daher sollte eine indirekte Lokalisierungsmethode, die bereits erfolgreich bei α -helikalen Strukturen angewandt wurde, für β -Faltblattstrukturen eingesetzt werden. Studien konnten zeigen, daß über D-Aminosäure-Substitutionssets, α -Helices in Modell- und Neuropeptiden lokalisiert werden können (Krause *et al.*, 1995; Rothmund *et al.*, 1995). Diese Lokalisierungsmethode beruht auf dem Sekundärstruktur-destabilisierenden Effekt von D-Aminosäuren, wenn diese gegen die entsprechende L-Aminosäure ausgetauscht werden. Durch eine systematische Substitution der Aminosäuren entlang der Sequenz gelingt es, eine orts aufgelöste Störung der Struktur vorzunehmen. Dabei hat sich gezeigt, daß der destabilisierende Effekt wesentlich stärker ausfällt, wenn zwei benachbarte Aminosäuren, anstatt einer einzelnen, ausgetauscht werden (Krause *et al.*, 1995). Die Strukturdestabilisierung läßt sich durch den Wechsel in der Chiralität der Seitenkette, die zu einer Änderung ihrer Orientierung innerhalb der Sequenz führt, erklären. Der Vorteil dieser Substitution liegt darin, daß sie unter Erhalt von Hydrophobie, Seitenkettenfunktionalität und Ladungsverteilung erfolgt.

Für die Untersuchungen wurde als Leitsubstanz das Peptid VT6 ausgewählt, da es sich hierbei um die kürzeste, zur Ausbildung stabiler β -Faltblattstrukturen befähigte VT-Sequenz handelt. In Tabelle 4 ist das Set der synthetisierten D-Analoga dargestellt. An den Positionen in der Sequenz, an denen Glycin lokalisiert ist, wurde nur die Nachbaraminosäure ausgetauscht. Zur Detektion konformationeller Veränderungen infolge des D-Aminosäure-Austausches wurden CD- und HPLC-Untersuchungen durchgeführt.

Tabelle 4. Doppel D-Aminosäure-Substitutionsset des VT6

Sequenz ¹	D-Aminosäure-Substitution
DPKGD PKGVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	-
<u>D</u> PKGD PKGVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	d1, p2
DP <u>K</u> GD PKGVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	k3
DPKG <u>D</u> PKGVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	d5, p6
DPKGD P <u>K</u> GVTVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	k7
DPKGD PKG <u>V</u> T VTVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	v9, t10
DPKGD PKGV T <u>V</u> T VTVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	v11, t12
DPKGD PKGVTV T <u>V</u> T VTVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	v13, t14
DPKGD PKGVTVTV T <u>V</u> T VTVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	v15, t16
DPKGD PKGVTVTVTV T <u>V</u> T VTVTVTVTVTVTVTVTVTGKGD PKD	v17, t18
DPKGD PKGVTVTVTVTV T <u>V</u> T GKGD PKD	v19, t20
DPKGD PKGVTVTVTVTVTV T <u>K</u> GD PKD	k22
DPKGD PKGVTVTVTVTVTVTV T <u>D</u> PKD	d24
DPKGD PKGVTVTVTVTVTVTVTV T <u>P</u> K PD	p25, k26
DPKGD PKGVTVTVTVTVTVTVTV T <u>P</u> D	p27, d28

¹ D-Aminosäuren sind unterstrichen.

CD-Untersuchungen. CD-Untersuchungen in Wasser haben gezeigt, daß D-Aminosäure-Substitutionen die Konformation des VT6 in unterschiedlicher Weise beeinflussen (Abb. 11). Beim Austausch in den terminalen Oktapeptidsequenzen bleiben die charakteristischen β -Faltblattstruktur-Spektren erhalten. Im Gegensatz dazu sind die CD-Spektren der Peptidanaloga, bei denen in der VT-Domäne substituiert wurde, durch einen typischen Verlauf für ungeordnete Strukturen gekennzeichnet (Abb. 11 A). Der Vergleich der Intensität der molaren Elliptizität bei 195 nm für das gesamte Set, also dem Wert, der die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen anzeigt, ist in Abb. 11 B dargestellt. Hieraus wird deutlich, daß es selektiv zum Struktureinbruch kommt, wenn D-Aminosäuren in die zentrale VT-Domäne (Positionen 9-20) eingeführt werden, während der Einbau in die N- (Position 1-7) und C-terminalen (22-28) Oktapeptidsequenzen die Strukturierung kaum beeinflußt. Damit konnte gezeigt werden, daß sich die β -Faltblattstruktur tatsächlich über die VT-Region erstreckt.

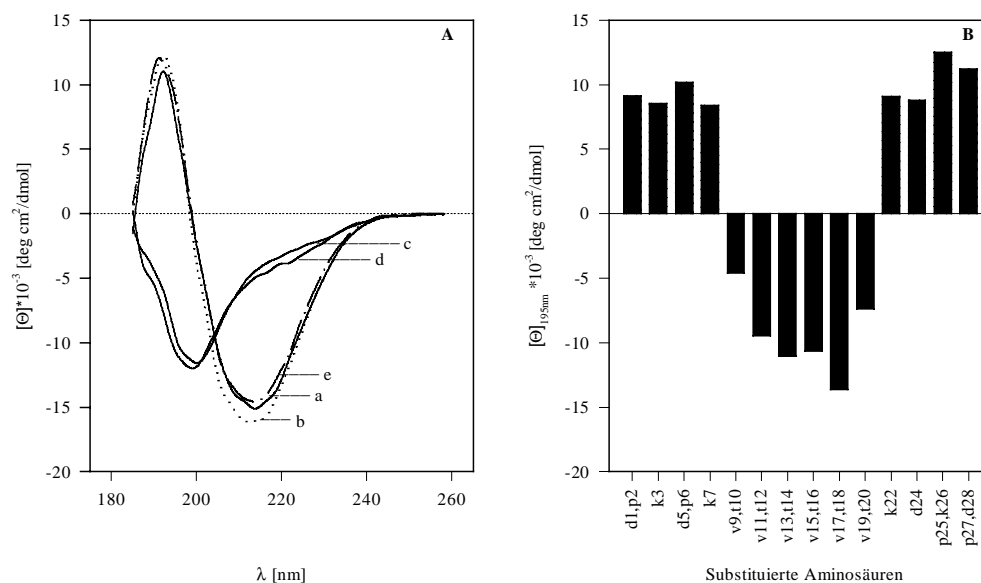


Abb. 11. Einfluß der Position der D-Aminosäure-Substitution auf die Strukturstabilität des β -faltblattstrukturierten VT6. (A) CD-Spektren vom VT6 und ausgewählten D-Analoga (5×10^{-5} M) in Wasser [(a) VT6, (b) dl,p2, (c) v11,t12, (d) v15,t16 (e) d24] und (B) Vergleich der molaren Elliptizität des gesamten Sets bei 195 nm.

HPLC-Untersuchungen. Anisotrope Grenzflächen können bei amphipathischen Peptiden die Ausbildung von Sekundärstrukturen induzieren und stabilisieren (vgl. Kap. 1.2.1.). Ein solches anisotropes System wird auch bei der RP-Chromatographie, bestehend aus einer hydrophoben stationären Phase und einer wäßrigen mobilen Phase, erzeugt. Die Induktion von Sekundärstrukturen, die insbesondere an amphipathisch α -helikalen Sequenzen untersucht wurde, beeinflußt die Retentionszeit von Peptiden und Proteinen (Zhou *et al.*, 1990; Blondelle & Houghten, 1992). Die Strukturinduktion, die durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den n-Alkylgruppen der stationären Phase und den Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren bestimmt wird, führt zur Ausbildung von bevorzugten hydrophoben Bindungsdomänen (vgl. Abb. 5) und damit zu einer längeren Verweildauer der amphipathisch α -helikalen Sequenzen auf den RP-Säulen (Zhou *et al.*, 1990). Strukturstörungen durch den Einbau von D-Aminosäuren in amphipathische α -Helices bewirken einen gegenteiligen Effekt, sie schwächen die hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Die damit verbundene Verkürzung der Retentionszeit kann wie die

spektralen Änderungen bei CD-Untersuchungen dazu genutzt werden, um amphipathische α -Helices mit Hilfe von D-Aminosäure-Substitutionssets zu lokalisieren (Krause *et al.*, 1995; Krause *et al.*, 1997).

Die Gegenwart einer hydrophob/hydrophilen Grenzfläche führt, wie am Beispiel des SDS nachgewiesen (vgl. Abb. 10 C und D), zur Stabilisierung amphipathischer β -Faltblattstrukturen. Das Retentionsverhalten des Peptides VT6 auf einer hydrophoben Säule ist durch einen sehr breiten Peak charakterisiert (Abb. 12 A). Eine solche Abweichung vom normalen HPLC-Verhalten, verursacht durch starke Assoziation, wurde auch schon bei anderen β -faltblattstrukturierten Peptiden festgestellt (Forood *et al.*, 1995). VT6-Peptide mit D-Aminosäure-Substitutionen in der VT-Domäne geben dagegen scharfe Peaks mit deutlich verkürzter Retentionszeit (Abb. 12 B).

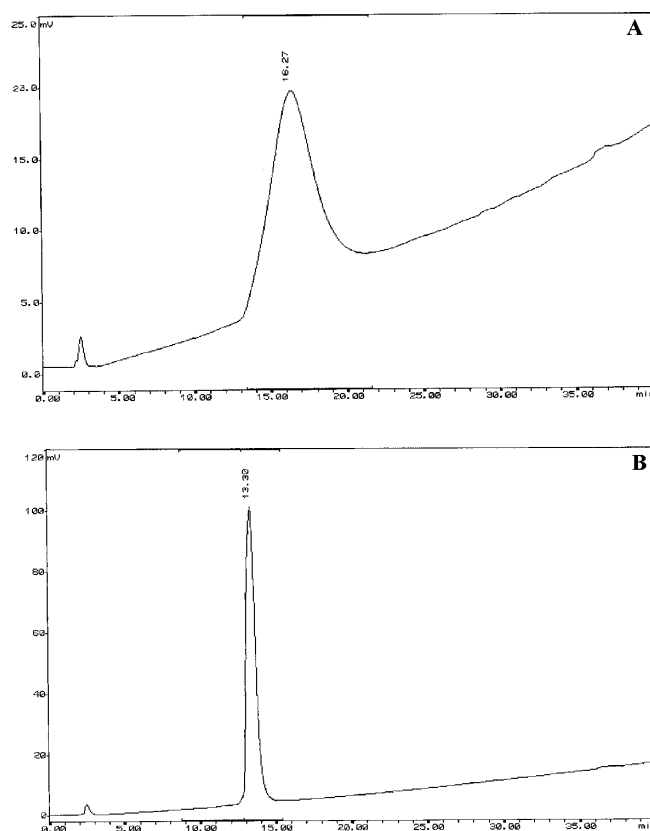


Abb. 12. Chromatographisches Verhalten von (A) VT6 und (B) dem in Position v15,t16 substituierten D-Analogon (beide 1 mg/ml) an einer PolyEncap A300 Säule. Experimentelle Bedingungen bei der RP-HPLC: linearer AB-Gradient mit 5-75% B in 40 min (Eluent A: 0.1% TFA in Wasser; Eluent B: 0.1% TFA in 80% ACN/ 20% Wasser), Flußrate 1 ml/min.

Der Einfluß der Position der D-Aminosäure-Substitution auf das Retentionsverhalten des VT6 ist in Abb. 13 dargestellt. Während Substitutionen in den Oktapeptidsequenzen das chromatographische Verhalten kaum beeinflussen, führt der L-/D-Aminosäure-Austausch in der VT-Domäne zu einer signifikanten Verringerung der Retentionszeit.

Sowohl mit den CD- als auch mit den HPLC-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, β -Faltblattstrukturen durch den Einbau von D-Aminosäuren zu destabilisieren sowie über einen kompletten Austausch entlang der Sequenz zu lokalisieren. Es konnte nachgewiesen werden, daß sich die β -Faltblattstruktur-Domäne ausschließlich über die VT-Region erstreckt.

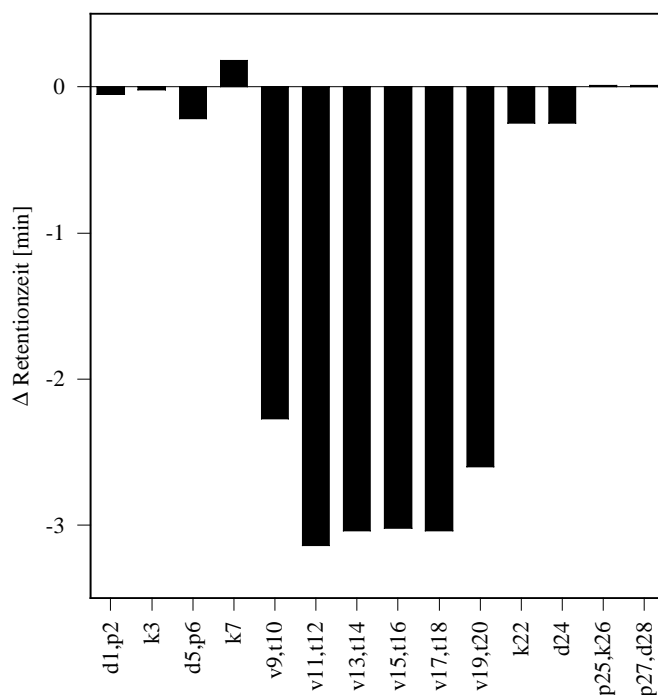


Abb. 13. Einfluß von D-Aminosäure-Substitution auf das RP-HPLC Verhalten des Peptides VT6. Darstellung der Differenz in den Retentionszeiten durch positionsspezifische Substitution im Vergleich zum unsubstituierten VT6 (16,3 min). Experimentelle Bedingungen: wie in Abb. 12 beschrieben.

2.1.2.6. Einfluß von D-Aminosäure-Substitutionen auf stabile β -Faltblattstrukturen

Um den Einfluß von strukturstörenden D-Aminosäuren in Abhängigkeit von der Stabilität der β -Faltblattstruktur einschätzen zu können, wurde der Effekt von Doppel-D-Aminosäure-Substitutionen auf die Konformation der Peptide mit sechs bis acht VT-Paaren untersucht. Die Substitutionen wurden dabei im Zentrum der VT-Region durchgeführt (Tabelle 5), da dort der destabilisierende Effekt am größten ist (vgl. Abb. 11 und 13).

Tabelle 5. D-Aminosäure-Substitutionen im Zentrum der VT-Domäne.

(VT) _n -DD Peptide	Sequenz ¹	D-Aminosäure- Substitution
VT6-DD	DPKGDPKGVTVTVTVtVTVT...GKGDPKPD-NH ₂	v15,t16
VT7-DD	DPKGDPKGVTVTVTVtVTVTVT..GKGDPKPD-NH ₂	v15,t16
VT8-DD	DPKGDPKGVTVTVTVTVtVTVTVTGKGDPKPD-NH ₂	v17,t18

¹D-Aminosäuren sind kursiv dargestellt.

CD-Untersuchungen (Abb. 14 A) der substituierten Peptide zeigen, daß sich der strukturstörende Einfluß der D-Aminosäuren mit der Verlängerung der VT-Domäne verringert. Während die Substitution im VT6 (Abb. 14 A, Spektrum a), wie bereits in Abb. 11 dargestellt, zum Struktureinbruch führt, gelingt es schon bei der um ein VT-Paar längeren Sequenz nicht mehr, die β -Faltblattstrukturierung effizient zu stören. Die Peptide VT7-DD und VT8-DD sind trotz der Substitution β -faltblattstrukturiert (Abb. 14, Spektren b und c). Der Intensitätsanstieg in der negativen Bande bei 218 nm vom VT7-DD zum VT8-DD zeigt, daß sich der destabilisierende Einfluß der D-Aminosäuren mit der Verlängerung und der damit verbundenen Stabilisierung der β -Faltblattstruktur in der VT-Domäne abschwächt. Die CD-Spektren dieser D-Analoga unterscheiden sich von denen der L-Peptide (vgl. Abb. 9, Spektren e und f). Sie sind zu höheren Wellenlängen verschoben, was anhand der Verschiebung des Minimums nach 218 nm (von 214 nm) und des Nulldurchganges nach 203-205 nm (von 200 nm) deutlich wird. Der Abfall der Intensität bei 218 nm bei den D-Analoga im Vergleich zu den nicht substituierten Peptiden zeigt die Destabilisierung der β -Faltblattstruktur an.

FTIR-Untersuchungen (Abb. 14 B) konnten die Resultate der CD-Messungen bestätigen. Das FTIR-Spektrum des VT6-DD (Abb. 14 B, Spektrum a) ist bei der im Vergleich zu den CD-Untersuchungen 10-fach höheren Konzentration durch die für ungeordnete Strukturen typische breite Amid-I-Bande bei 1645 cm⁻¹ dominiert. Die schwache Bande bei 1620 cm⁻¹, die die Herausbildung von β -Faltblattstrukturen anzeigt, verdeutlicht, daß sich ein konzentrationsabhängiger Übergang vom ungeordneten in den β -faltblattstrukturierten Zustand vollzieht. Die Amid-I-Bande bei 1621 cm⁻¹ dominiert die FTIR-Spektren der Peptide VT7-DD und VT8-DD (Abb. 14 B, Spektren b und c). Die für ungeordnete Strukturen charakteristische Bande bei 1647 cm⁻¹ ist beim VT7-DD sehr schwach bzw. beim VT8-DD

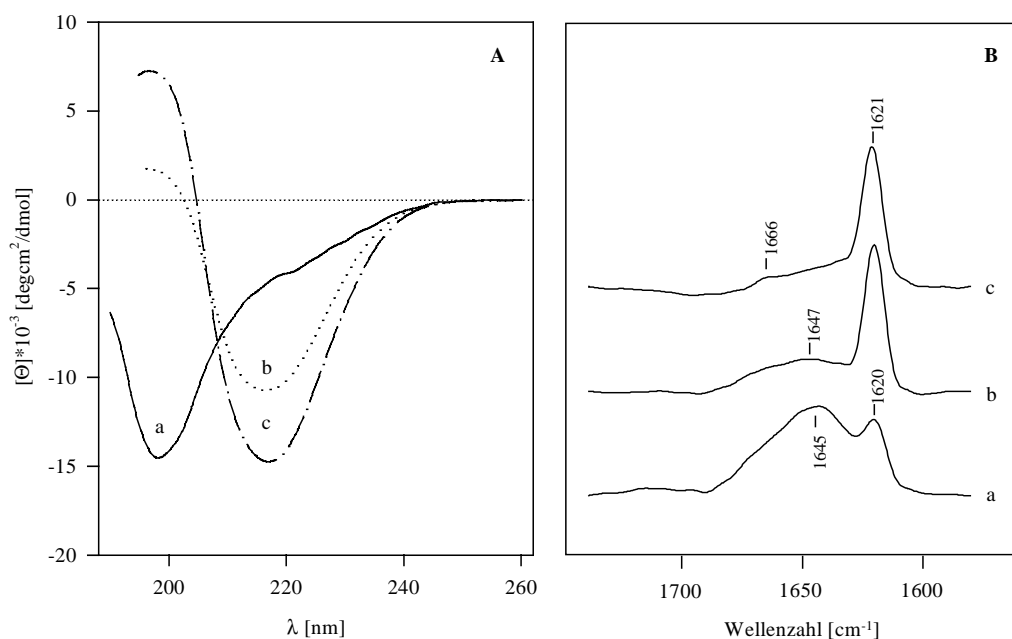


Abb. 14. Konformationeller Einfluß von D-Aminosäure-Substitutionen im Zentrum der β -faltblattstrukturierten VT-Domäne [(a) VT6-DD, (b) VT7-DD, (c) VT8-DD]. (A) CD-Spektren in Wasser bei einer Peptidkonzentration von 5×10^{-5} M und (B) FTIR-Spektren in der Amid-I-Region nach Fourier-Dekonvolution in D_2O -Puffer (30 mM Natriumphosphat, pH 2.2) bei einer Peptidkonzentration von 5×10^{-4} M.

nicht mehr vorhanden, was darauf hindeutet, daß sich die β -Faltblattstruktur stabilisiert. Interessanterweise fehlt die für antiparallele β -Faltblattstrukturen typische hochfrequente Bande um 1690 cm^{-1} (Bandekar & Krimm, 1986). Obwohl dies als die Ausbildung von parallelen β -Faltblattstrukturen interpretiert werden könnte (Yamada *et al.*, 1998), ist es auf der Basis der CD- und IR-Daten nicht möglich, eine endgültige Bestimmung der Anordnung der β -Stränge vorzunehmen.

2.1.3. Assoziationsverhalten

Um das konformationelle Verhalten der $(\text{VT})_n$ -Peptide und der D-Aminosäure-substituierten $(\text{VT})_n$ -DD-Peptide mit deren Assoziationsneigung in Zusammenhang zu bringen, wurden Untersuchungen mit Hilfe der Größenausschlußchromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC), der Analytischen Ultrazentrifugation (UZ) und der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) durchgeführt.

2.1.3.1. Größenausschlußchromatographie

Die SEC trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe. Sie beruht auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Für die Trennung ist dabei das hydrodynamische Volumen der Moleküle entscheidend. Sind die Moleküle kleiner als die Poren, so können sie in diese eindringen. Je nach ihrer Größe verweilen sie unterschiedlich lange auf der Säule. Die kleinsten Komponenten haben die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und eluieren somit zuletzt. Moleküle, die größer als die Poren sind, werden von der Permeation ausgeschlossen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlußvolumen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Komponenten wird die Säule mit Eichsubstanzen kalibriert.

Das Assoziationsverhalten der $(VT)_n$ - und $(VT)_n$ -DD-Peptide wurde konzentrationsabhängig bei 1×10^{-4} M und 1×10^{-3} M untersucht (Abb. 15). Unstrukturierte VT-Peptide besitzen ein Elutionsvolumen von 9 ml, was dem Molekulargewicht der monomeren Peptide entspricht (Auflistung der Molekulargewichte, vgl. Tabelle 6, Kap. 2.1.3.2.).

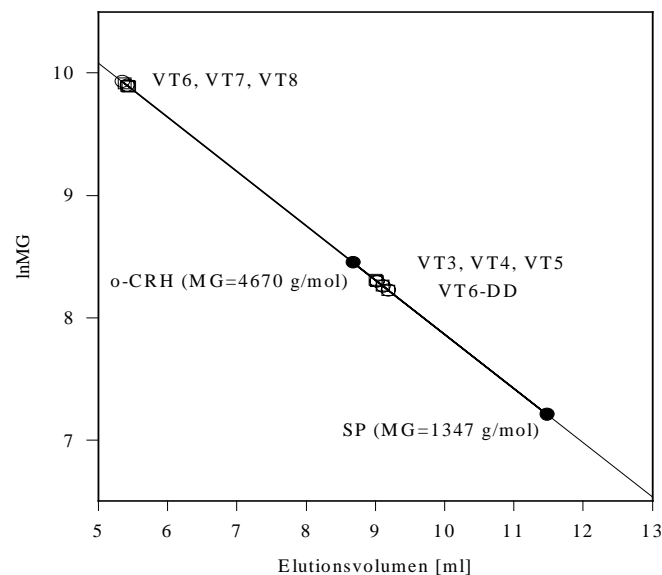


Abb. 15. SEC-Untersuchungen von $(VT)_n$ - und $(VT)_n$ -DD-Peptiden bei Konzentrationen von (□) 1×10^{-4} M und (O) 1×10^{-3} M (VT5 nur bei 1×10^{-4} M) an einer TSK Säule 2000 SW. Experimentelle Bedingungen: isokratisch, 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 4,4), 1 ml/min. Zur Kalibrierung der Säule wurden die Peptide Substanz P (SP) und *corticotropin releasing hormone* (o-CRH) verwendet.

Der im Kapitel 2.1.2.2. beschriebene konzentrationsabhängige Übergang in eine β -Faltblattstruktur führt beim VT5 bei einer Konzentration von 1×10^{-3} M zu einem Assoziationsgleichgewicht zwischen Monomeren (9,0 ml) und hochmolekularen Assoziaten (5,4 ml) (Abb. 16).

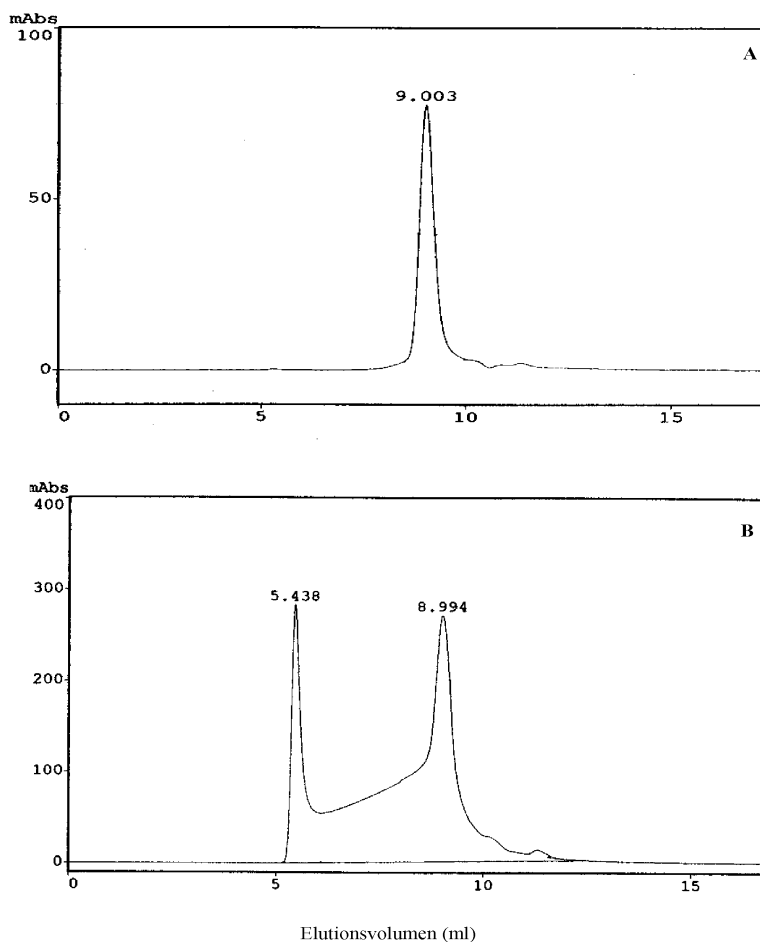


Abb. 16. Konzentrationsabhängiger Übergang von einem ungeordneten, monomeren Zustand des VT5 bei (A) 1×10^{-4} M in eine β -Faltblattstruktur bei (B) 1×10^{-3} M, die zu einem Assoziationsgleichgewicht zwischen Monomeren und hochmolekularen Assoziaten führt. Experimentelle Bedingungen: wie in Abb. 15 beschrieben.

Peptide in stabilen β -Faltblattstrukturen (VT6, VT7, VT8) eluieren im Ausschlußvolumen bei ca. 5,4 ml (Abb. 15), was auf eine sehr starke Assoziation hinweist. Eine Bestimmung der Assoziatgröße konnte nicht vorgenommen werden, da der hydrodynamische Radius, der durch die Geometrie der Partikel bestimmt wird, das Elutionsvolumen beeinflusst. Die Chromatogramme der Peptide VT7-DD und VT8-DD sind durch drastisch reduzierte Absorptionsintensitäten charakterisiert, so daß eine Auswertung nicht möglich war. Dieses

Verhalten und auch eine Verringerung der Peakflächen in der Reihe vom VT5 zum VT8 ($\approx 190000 \rightarrow \approx 55000$ bei 1×10^{-3} M) deuten darauf hin, daß ein wesentlicher Anteil der Peptidassoziate die Säule nicht passiert, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund ihrer Größe, die mittels UZ und DLS nachgewiesen werden konnte, auf dem Säulenkopf verbleibt.

2.1.3.2. Dynamische Lichtstreuung und Analytische Ultrazentrifugation

Bei der *DLS* werden die Fluktuationen des durch flüssigkeitsdispergierte Teilchen gestreuten Lichtes zeitlich analysiert. Die Intensitätsschwankungen des Streulichtes beruhen auf der Brown'schen Molekularbewegung der Teilchen. Sie sind diffusionsbedingt. Die Methode gestattet daher über die Zeitcharakteristik der Intensitätsschwankungen die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten vorzunehmen.

Unter Berücksichtigung der Stokes-Einstein-Beziehung kann über den Diffusionskoeffizienten D der Stokes-Radius (hydrodynamischer Radius) R_s der Teilchen berechnet werden:

$$R_s = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}. \quad (1)$$

Darin bedeuten k_B die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und η die Viskosität des Dispergiermediums. R_s stellt den Radius einer Äquivalentkugel dar und entspricht daher nur bei globulären Teilchen nahezu dem Molekülradius. Bei polydispersen Proben kann die Verteilung der Molekülradien über mathematische Verfahren berechnet werden.

Bei der *UZ* wird das Sedimentationsverhalten der Partikel in einem Schwerfeld untersucht. Die Kraft, die die Teilchen zur Sedimentation bewegt, ist proportional zu ihrer Masse. Unter dem Einfluß der Zentrifugalbeschleunigung nehmen die Teilchen mit steigender Umdrehungsgeschwindigkeit eine erhöhte Sedimentationsgeschwindigkeit an, wobei die Reibungskraft einem unbegrenzten Anstieg der Geschwindigkeit entgegenwirkt. Der Sedimentationskoeffizient s steht daher im Zusammenhang mit dem Molekulargewicht M und dem molaren Reibungskoeffizienten f :

$$s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A \cdot f}. \quad (2)$$

Darin ist ρ die Dichte des Lösungsmittels, \bar{v} das partielle spezifische Volumen der Makromoleküle und N_A die Avogadrozahl. Der Sedimentationskoeffizient hat die Dimension einer reziproken Zeit und wird in Svedberg-Einheiten angegeben ($1S=10^{-13}$ sec).

Durch Zusammenfassung der Einstein-Beziehung

$$f = \frac{k_B \cdot T}{D}, \quad (3)$$

die den Zusammenhang zwischen molaren Reibungskoeffizienten und dem Diffusionskoeffizienten beschreibt und der Gleichung (2) sowie durch Substitution von $N_A k_B$ mit R (Gaskonstante), ergibt sich die Svedberg-Gleichung

$$M = \frac{s \cdot R \cdot T}{(1 - \bar{v}\rho) \cdot D}. \quad (4)$$

Sie ermöglicht die Berechnung des Molekulargewichts der Teilchen aus Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten.

Die Ergebnisse der UZ- und DLS-Experimente sind in Tabelle 6 dargestellt. Sie korrelieren sehr gut mit den Resultaten der SEC-Untersuchungen, gestatten aber wesentlich differenziertere Aussagen zum Ausmaß des Assoziationsgeschehens.

Um den Grad der Assoziation abschätzen zu können, wurde aus den Daten der Sedimentationsanalysen das Molekulargewicht der Assoziante berechnet. Unstrukturierte Peptide (VT3 und VT4) assoziieren nicht. Die gefundenen Molekulargewichte entsprechen denen der monomeren Peptide. Die Assoziation beginnt mit der Herausbildung von β -Faltblattstrukturen. Dies wird verdeutlicht durch den starken Anstieg bzw. Abfall der Sedimentations- bzw. Diffusionskoeffizienten beim Übergang zum VT5, welches konzentrationsabhängig β -Faltblattstrukturen ausbildet. Bei einer Konzentration von 1 mg/ml wird ein Molekulargewicht der Assoziante von 550 kDa bestimmt. Dies entspricht einer Zusammenlagerung von nahezu 200 Monomeren. Eine weitere Verstärkung des Assoziationsverhaltens wird bei den Peptiden ab einer Domänenlänge von sechs VT-Paaren festgestellt. Die Stabilisierung der β -Faltblattstrukturen führt hier zu Peptidassoziaten von über 2000 kDa. Bei diesen Peptiden verlief die Sedimentation allerdings so schnell, daß die Bestimmung der Assoziatgröße mit Unsicherheiten behaftet ist und daher eine Abschätzung der durchschnittlichen Molekulargewichte vorgenommen wurde. Die ansteigenden Sedimentations- und abfallenden Diffusionskoeffizienten in der Reihe vom VT5 zum VT8 verdeutlichen aber, daß der Grad der Assoziation mit der Stabilisierung der β -Faltblattstruk-

Tabelle 6. Assoziationsverhalten von (VT)_n- und (VT)_n-DD-Peptiden

Peptid	Analytische Ultrazentrifugation				Dynamische Lichtstreuung
	M [kDa] ¹	s _{20, w} [S] ²	D _{20, w} [10 ⁻⁷ cm ² /s] ³	M _{sD} [kDa] ⁴	D _{20, w} [10 ⁻⁷ cm ² /s]
VT3	2.208	0,462 ± 0,005	18,80 ± 0,09	2,204 ± 0,027	-
VT4	2.408	0,491 ± 0,016	17,87 ± 0,14	2,504 ± 0,102	-
VT5	2.608	17,16 ± 0,05	2,85 ± 0,05	556,3 ± 11,6	1,35 ± 0.06
VT6	2.808	42,3 ± 1	1,54 ± 0,04	2000 ^a	0,85 ± 0.06
VT7	3.008	70 ^a	1-2 ^a	2500 ^a	0,42 ± 0.03
VT8	3.209	120 ^a	<1 ^a	>3000 ^a	0,31 ± 0.02
VT6-DD	2.808	10,2 ± 2	4 ± 1	240 ± 95	-
VT7-DD	3.008	100 ^a	<1 ^a	2000 ^a	1,34 ± 0.02
VT8-DD	3.209	130 ^a	<1 ^a	>2000 ^a	-

¹ berechnetes Molekulargewicht, ^{2,3} Sedimentations- und Diffusionskoeffizient in wäßriger Lösung, bei 20°C,

⁴ experimentell aus den Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten ermitteltes Molekulargewicht,

^a geschätzter Durchschnittswert

turen einhergeht. Der Unterschied in den ermittelten Diffusionskoeffizienten bei den UZ- und DLS-Experimenten kann durch den Zusatz von Natriumchlorid bei der UZ erklärt werden. Bei pH 4,4 nehmen die Peptide eine positive Nettoladung an. Die daraus resultierende Streckung der Moleküle kann durch Natriumchlorid teilweise überwunden werden, wodurch es zu einem Anstieg der Diffusionskoeffizienten kommt.

Der in den Konformationsuntersuchungen gezeigte unterschiedliche Einfluß von D-Aminosäure-Substitutionen auf β -Faltblattstrukturen kann durch die Assoziationsexperimente bestätigt werden. Kurze β -Faltblattstrukturen werden durch die Substitutionen sehr stark in ihrem Assoziationsverhalten beeinträchtigt, während der Einfluß auf ausgedehntere Sequenzen eher schwach ausfällt. Beim VT6-DD ist das Molekulargewicht der Peptidassoziate gegenüber dem des unsubstituierten Peptides (VT6) deutlich verringert, was mit der beträchtlichen Störung der β -Faltblattstrukturierung korreliert. Der hier festgestellte Unterschied im Assoziationsverhalten zu den SEC-Untersuchungen, bei denen trotz einer höheren Ausgangskonzentration von 1×10^{-3} M keine Assoziation von VT6-DD

festgestellt werden konnte, kann durch den Verdünnungseffekt der Probe entlang der Säule erklärt werden. Dieser führt zu einer geringeren Meßkonzentration bei der SEC, die sich gerade bei der konzentrationsabhängigen β -Faltblattstruktur-Ausbildung bemerkbar macht. Die Verlängerung der VT-Domäne auf sieben und acht Paare führt wieder zur Ausbildung hochmolekularer Assoziate von durchschnittlich über 2000 kDa.

Interessanterweise kommt es trotz der beträchtlichen Molekulargewichte der Assoziate nicht zur Präzipitation. Als Ursache hierfür können die hydrophilen N- und C-terminalen Oktapeptidsequenzen angesehen werden. Sie sind kurz genug, um eine antiparallele Anordnung der Peptide zuzulassen, gleichzeitig vermitteln sie aber die Löslichkeit der Assoziate. Damit haben die VT-Peptide einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen synthetischen β -Faltblattstruktur-bildenden Peptiden, bei denen eine geringe Wasserlöslichkeit beobachtet wurde (z.B.: Ostermann & Kaiser, 1985; Altmann *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1993; Lazo & Downing, 1997).

2.1.4. Bildung amyloider Strukturen

Amyloide Strukturen sind, wie im Kapitel 1.1.1. beschrieben, durch einen hohen Anteil an assoziierenden β -Faltblattstrukturen (cross- β -Struktur), ihre CR-Anfärbbarkeit und fibrilläre Morphologie charakterisiert. Die Ausbildung stabiler, stark assoziierter β -Faltblattstrukturen konnte bei $(VT)_n$ -Peptiden, $n \geq 6$ und $(VT)_n$ -DD-Peptiden, $n \geq 7$ nachgewiesen werden (vgl. Kap. 2.1.2. und 2.1.3.). Ob die Peptidassoziation tatsächlich zu hochgeordneten, fibrillären Strukturen führt, sollte mit Hilfe der CR-Anfärbung und der Elektronenmikroskopie bestimmt werden.

2.1.4.1. Kongo Rot Anfärbung

CR-angefärbte Amyloide erzeugen zwischen gekreuzten Polarisatoren eine grüne Doppelbrechung. Voraussetzung für die CR-Bindung ist die β -Faltblattstruktur und deren Anordnung in Fibrillen (Glenner *et al.*, 1972; Klunk *et al.*, 1989). Obwohl der molekulare Mechanismus der CR-Bindung nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt es hinsichtlich der Ausrichtung des Farbstoffes zwei alternative Vorstellungen. Der Farbstoff lagert sich zwischen zwei antiparallel zueinander ausgerichtete β -Stränge ein (Turnell & Finch, 1992; Carter & Chou, 1998), oder er ist in Fibrillenrichtung, d.h. senkrecht zu den β -Strängen

orientiert (Klunk *et al.*, 1989). Durch die Ausrichtung der Farbstoffmoleküle zueinander verschiebt sich ihre UV/VIS-Absorption zu höheren Wellenlängen (Klunk *et al.*, 1989), was auf die Bildung von J-Aggregaten zurückzuführen ist. Der Effekt der grünen Doppelbrechung unter gekreuzten Polarisatoren kann mit der verstärkten Doppelbrechung der Amyloid-Fibrillen aufgrund der eingelagerten Farbstoffmoleküle erklärt werden (Turnell & Finch, 1992).

Abb. 17 zeigt, daß hochmolekulare $(VT)_n$ - und $(VT)_n$ -DD-Peptide in der Lage sind, CR zu binden. Die angefärbten Peptidaggregate erscheinen rot im Hellfeld (Abb. 17 A) und gelb bzw. grün zwischen gekreuzten Polarisatoren (Abb. 17 B).

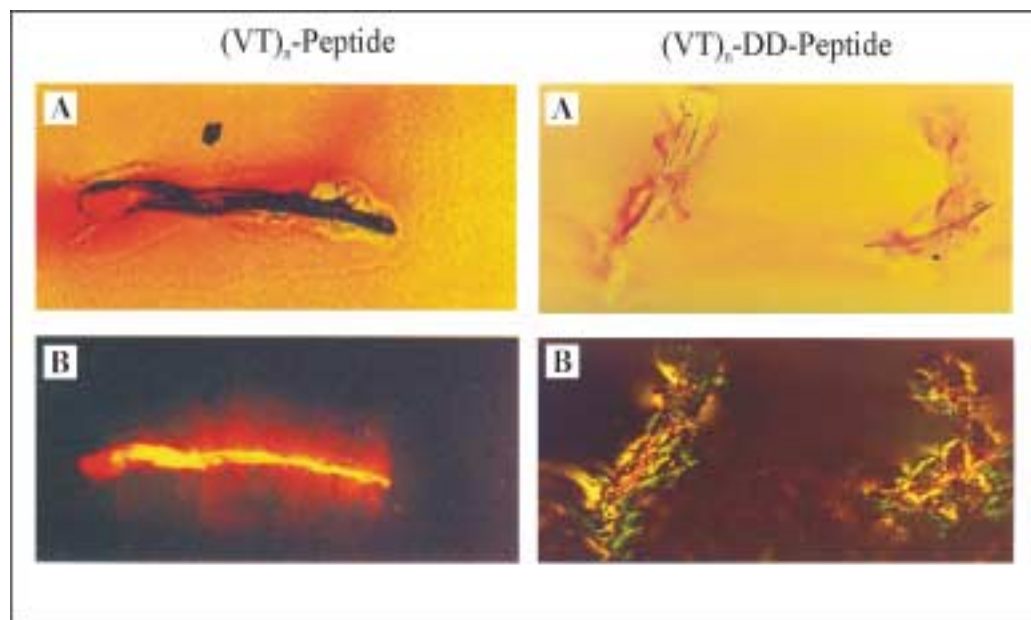


Abb. 17. CR-Anfärbung von $(VT)_n$ - (VT_7) und $(VT)_n$ -DD-Peptidaggregaten (VT_8 -DD). (A) Hellfeld und (B) gekreuzte Polarisatoren, Vergrößerung 400 x.

Hieraus läßt sich ableiten, daß die Peptidaggregate einen anisotropen Charakter besitzen, der die Existenz einer regulären Anordnung der β -Stränge beschreibt. Interessant ist, daß gerade die $(VT)_n$ -DD-Peptide die charakteristische grüne Doppelbrechung erzeugen, während die der $(VT)_n$ -Peptide gelb ist. Daraus kann eine unterschiedliche Wechselwirkung des Farbstoffes mit den Peptidaggregaten abgeleitet werden, die sich auch im unterschiedlichen Fibrillencharakter bemerkbar macht (siehe Elektronenmikroskopie).

2.1.4.2. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen, daß es zur Ausbildung geordneter Strukturen kommt. Die Peptide bilden Fibrillen (Abb. 18). Es bestehen jedoch morphologische Unterschiede zwischen den Fibrillen der $(VT)_n$ - und $(VT)_n$ -DD-Peptide. Die unverzweigten, gekrümmten Fibrillen der $(VT)_n$ -Peptide sind 7-9 nm breit und bis zu 100 nm lang. Sie entsprechen in ihren Dimensionen denen von Amyloiden, die 5-13 nm breit sind, und Längen bis zu 3 μm aufweisen (Lansbury, 1992; Rochet & Lansbury, 2000), jedoch eine gestreckte Form besitzen. Die Fibrillen der $(VT)_n$ -DD-Peptide sind 5-7 nm breit, aber wesentlich länger (bis zu 350 nm). Ihre gestreckte Form, die auf eine höhere Ordnung der Struktur im Vergleich zu den $(VT)_n$ -Peptiden hinweist, entspricht sehr gut dem morphologischen Erscheinungsbild von natürlichen Amyloiden. Sowohl die Fibrillenmorphologie als auch die grüne Doppelbrechung nach der CR-Anfärbung weisen darauf hin, daß die $(VT)_n$ -DD-Peptide die besseren Amyloid-Bildner sind.

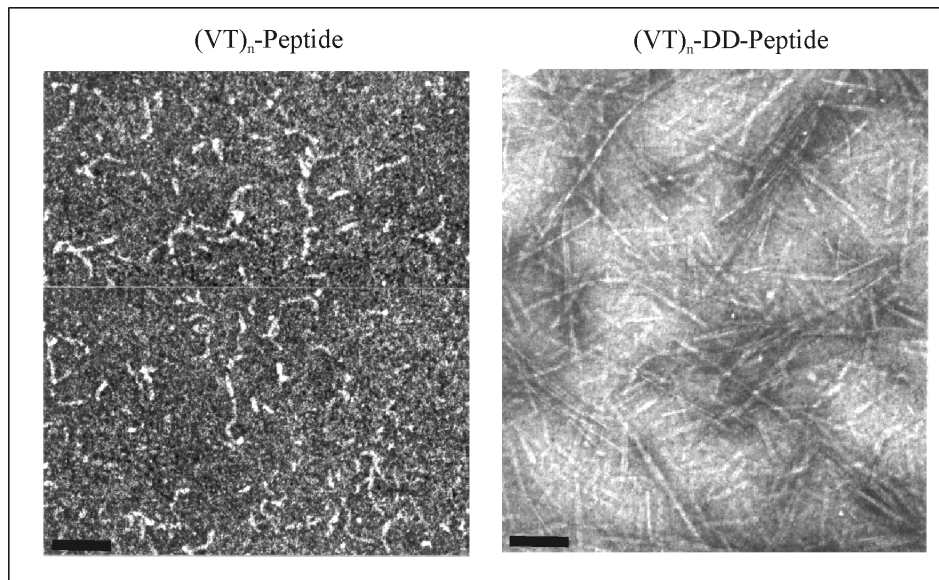


Abb. 18. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Fibrillen (2% wäßriges Uranylacetat) aus wäßrigen Lösungen (2×10^{-4} M) von $(VT)_n$ - (VT_8) und $(VT)_n$ -DD-Peptiden (VT_8 -DD). Der Balken entspricht 100 nm.

Zusätzlich wurden die Peptide VT7 und VT7-DD (20 mg/ml in Wasser) mittels Röntgen-Weitwinkelstreuung und Röntgen-Kleinwinkelstreuung untersucht (Damaschun, persönliche Mitteilung). Im Röntgen-Weitwinkelstreudiagramm wurden Reflexe bei Braggwerten von 1,05 nm und 0,47 nm nachgewiesen. Diese Abstände sind ein zwingender Beweis für das

Vorliegen einer cross- β -Struktur, einem wichtigen Charakteristikum von Amyloiden. Aus den Röntgen-Kleinwinkeldiagramm kann abgeleitet werden, daß die Amyloid-Fibrillen der beiden Peptide einen elliptischen Querschnitt mit den Abmessungen 10,6 nm x 5,3 nm (VT7) und 9,40 nm x 4,75 nm (VT7-DD) aufweisen. In den Amyloid-Fibrillen des VT7-DD ist gegenüber denen des VT7 die cross- β -Struktur etwas besser in Richtung der Fibrillenachse geordnet. Damit bestätigen die Streuexperimente sehr gut die über die Elektronenmikroskopie charakterisierte Morphologie der Amyloid-Fibrillen.

2.1.5. Bewertung der Peptidmodelle

Es konnte gezeigt werden, daß eine *de novo* Peptidsequenz in der Lage ist, über stabile β -Faltblattstrukturen in hochmolekulare, amyloide Strukturen zu assoziieren. Damit wird die Annahme gestützt, daß es sich bei Amyloiden um einen Zustand handelt, der von vielen Peptiden und Proteinen unter bestimmten Bedingungen eingenommen werden kann. Der amphipathische Charakter der VT-Sequenz begünstigt die Ausbildung und Stabilisierung der β -Faltblattstrukturen sowie deren Assoziation in Amyloid-Fibrillen. Diese Tatsache wurde kürzlich von einer anderen Studie bestätigt, die den Zusammenhang zwischen der Aminosäuresequenz und der Bildung von amyloiden Strukturen mittels kombinatorischer Bibliotheken beschrieben hat (West *et al.*, 1999). Danach bilden bevorzugt Sequenzen mit binären Mustern aus polaren und unpolaren Aminosäuren Amyloid-Fibrillen. In natürlich vorkommenden Polypeptiden ist dieser binäre Code jedoch selten vertreten (West *et al.*, 1999), was darauf schliessen läßt, daß im Laufe der Evolution eine Selektion gegen diese bevorzugt Fibrillen-bildenden Sequenzen stattgefunden hat. Damit wird unterstrichen, daß die Amyloid-Bildung kein sequenzspezifisches Phänomen ist.

Die hohe Stabilität der gebildeten β -Faltblattstrukturen gegenüber Temperatureinflüssen, denaturierenden Agentien, Veränderungen der Lösungsumgebung sowie Strukturdestabilisierenden Aminosäuren (vgl. Kap. 2.1.2.) unterstreicht die außergewöhnlich hohe Resistenz amyloider Strukturen und verdeutlicht damit auch die Schwierigkeiten, die mit der Suche nach therapeutischen Ansätzen, die die Auflösung bereits gebildeter Amyloid-Plaques zum Ziel haben, verbunden sind. Aufgrund ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit besitzen die VT-Peptide gegenüber einer Reihe anderer amyloider Peptidmodelle (wie z.B.: Aggelli *et al.*, 1997; Lazo & Downing, 1997; Zhang *et al.*, 1993) einen großen Vorteil. Mit ihnen konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen der Stabilisierung von β -Faltblattstrukturen und ihrem

Assoziationsvermögen beschrieben werden. Als einfache und vor allem sehr gut handhabbare Modelle, die in ihren abgestuften Eigenschaften hinsichtlich von Konformation und Assoziationsneigung umfassend charakterisiert sind, hat sich ihr Einsatz im Rahmen verschiedener Fragestellungen bereits bewährt.

- i) Für die Quantifizierung von Peptiden/Proteinen und die Interpretation von Massenspektren komplexer Peptidgemische (mass fingerprinting) wurden Untersuchungen zum Einfluß struktureller Faktoren auf die Ionisierungsausbeuten durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß die Signalintensität von Peptiden durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen beeinflusst wird. Im Vergleich zu unstrukturierten Peptiden (VT3, VT4) zeigen insbesondere β -faltblattstrukturierte Peptide (VT6, VT7, VT8), die eine hohe Assoziationsneigung besitzen, drastisch reduzierte Peakintensitäten (Wenschuh *et al.*, 1998).
- ii) Darüber hinaus wurden die Amyloid-bildenden VT-Peptide als geeignetes Modell für die Bewertung von Massenspektren hochassoziierender Alzheimer-Peptide genutzt (Kraus *et al.* 2000). Im Zentrum dieser Untersuchungen steht das Studium von Konformations-induzierten Assoziationsprozessen des Alzheimer-Peptides A β .
- iii) Studien zur Membrangängigkeit amphipathischer Peptide haben gezeigt, daß neben amphipatisch α -helikalen Peptiden auch kurze β -Faltblattstruktur-bildende Peptide wie das VT5 in das Zellinnere penetrieren und damit potentielle Vektoren für den Transmembrantransport von bioaktiven Oligopeptiden und Peptiden darstellen (Oehlke *et al.*, 1997).

2.2. Konformation und Assoziation des Alzheimer-Peptides A β (1-42)

Der strukturelle Übergang des Alzheimer-Peptides A β von einer löslichen, monomeren Form in eine assoziierende, β -faltblattstrukturierte Konformation wird als initialer Schritt für die Bildung pathogener Amyloid-Fibrillen angesehen (vgl. Kap. 1.3.2.). Zur Erkennung struktur-sensitiver Bereiche innerhalb der A β (1-42)-Sequenz, die diesen konformationellen Übergang auslösen, sollte die Sekundärstruktur des Peptides positionsspezifisch destabilisiert und damit die Umfaltung des Peptides initiiert werden. Wie im ersten Teil der Arbeit beschrieben, können durch D-Aminosäure-Substitutionen α -Helices und kurze β -Faltblattstrukturen lokal destabilisiert werden (vgl. Kap. 2.1.2.5. und 2.1.2.6.). Ein komplettes D-Aminosäure-Substitutionsset stellt ein geeignetes Werkzeug dar, um eine orts aufgelöste Strukturdestabilisierung vorzunehmen, ohne andere Eigenschaften des Peptides, wie z.B. Hydrophobie oder Seitenkettenfunktionalität, zu verändern. Damit sollte es möglich sein, konformationelle Veränderungen des A β zu untersuchen, ohne die für das Assoziationsverhalten des Peptides zentrale Bindungsdomäne in ihren hydrophoben Eigenschaften zu verändern. Da A β (1-42) eine ausgeprägte Assoziationstendenz besitzt, ist es wichtig, die Strukturstörung ausgehend von einer stabilen monomeren, löslichen Konformation des Peptides, wie sie z.B. in TFE vorliegt, vorzunehmen. In TFE ist das Peptid teilweise α -helikal strukturiert. Dieser Anteil korreliert mit Strukturvorhersagen nach Chou-Fasman. Es wird daher vermutet, daß ein konformationeller $\alpha \rightarrow \beta$ -Übergang des Alzheimer-Peptides einen möglichen Mechanismus für die Auslösung der Fibrillogenease darstellt.

2.2.1. Synthese und Reinigung eines A β (1-42) D-Aminosäure-Substitutionssets

Das Substitutionsset des A β (1-42) (Tabelle 7) besteht aus analogen Peptiden, die sich nur in den Positionen des Doppel-D-Aminosäure-Austausches unterscheiden. Das starke Aggregationsverhalten der Alzheimer-Peptide, das insbesondere bei der 42 Aminosäuren langen Variante durch den hydrophoben C-Terminus extrem verstärkt ist, führt aufgrund von Löslichkeitsproblemen zu Schwierigkeiten bei der Synthese und Reinigung der Peptide. Die Mehrzahl aller Studien wurde deshalb mit verkürzten Sequenzen des Alzheimer-Peptides durchgeführt. Als Strategien für die Herstellung des Gesamtmoleküls wurden Fragmentkupp-

Tabelle 7. Aβ(1-42) Doppel-D-Aminosäure-Substitutionsset

Peptid	Sequenz ¹	D-Aminosäure-Substitution
Aβ(1-42)	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	-
D-1/2	<u>DA</u> EFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	d1,a2
D-3/4	DA <u>EF</u> RHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	e3,f4
D-5/6	DAEF <u>RH</u> DSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	r5,h6
D-7/8	DAEFRH <u>DS</u> GY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	d7,s8
D-10/11	DAEFRHDS <u>G</u> Y ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	y10,e11
D-11/12	DAEFRHDSGY ¹⁰ <u>EV</u> HHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	e11,v12
D-13/14	DAEFRHDSGY ¹⁰ EV <u>HH</u> QKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ I	h13,h14
D-15/16	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHH <u>QK</u> LVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	q15,k16
D-17/18	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQK <u>L</u> VFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	l17,v18
D-19/20	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLV <u>FF</u> ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	f19,f20
D-21/22	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ <u>AE</u> DVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	a21,e22
D-23/24	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AED <u>V</u> GSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	d23,v24
D-26/27	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGS <u>N</u> KGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	s26,n27
D-27/28	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGS <u>NK</u> GA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	n27,k28
D-30/31	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNK <u>G</u> A ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	a30,i31
D-31/32	DAEFRHDSGY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ <u>I</u> IIGLMVGGVV ⁴⁰ IA	i31,i32
D-34/35	DAEFRH <u>DD</u> GY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIG <u>L</u> MVGGVV ⁴⁰ I	l34,m35
D-35/36	DAEFRH <u>DD</u> GY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIG <u>M</u> VGGVV ⁴⁰ I	m35,v36
D-39/40	DAEFRH <u>DD</u> GY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGG <u>V</u> V ⁴⁰ IA	v39,v40
D-41/42	DAEFRH <u>DD</u> GY ¹⁰ EVHHQKLVFF ²⁰ AEDVGSNKGA ³⁰ IIGLMVGGVV ⁴⁰ <u>I</u>	i41,a42

¹D-Aminosäuren sind unterstrichen.

lungen, der Einsatz von Fmoc-Aminosäurefluoriden, HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat) als Kupplungsreagenz sowie die chromatographische Reinigung unter basischen Bedingungen vorgeschlagen (Berger *et al.*, 1994; Milton *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, daß mittels automatischer Festphasensynthese und Fmoc-Chemie die Gesamtsequenz und 20 analoge Varianten des Aβ erfolgreich synthetisiert werden können. Das Standardprotokoll der Peptidsynthese wurde in der Weise geändert, daß für eine effiziente Abspaltung der Fmoc-Gruppe in der hydrophoben Region Ala 42-Lys 28 2% DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en[1,5-5]) zur Lösung aus 20% Piperidin/80% Dimethylformamid (v/v) zugesetzt wurden. Die Reinigung der Rohpeptide mittels RP-HPLC und dem Standard-Gradientensystem ACN/Wasser-0.1% TFA konnte dadurch verbessert werden, daß zur Verringerung der Peakbreiten unter erhöhten Temperaturen bei 85°C gearbeitet wurde. Die separierten Fraktionen wurden mittels MALDI-MS charakterisiert.

2.2.2. α -Helikale Domänen im A β (1-42)

Eine lösliche Form von A β (1-42) wurde in 80% TFE/20% Wasser (v/v) stabilisiert. Es konnte gezeigt werden, daß das Peptid unter diesen Bedingungen zu 40% α -helikal vorliegt (vgl. Abb. 23). Charakteristisch hierfür ist das Doppelminimum bei 208 und 222 nm. Eine Verringerung der TFE-Konzentration führte zum Anstieg des β -Faltblattstruktur-Anteils.

Zur Lokalisierung der Sekundärstrukturelemente wurden NMR-Untersuchungen durchgeführt. Die komplette Bestimmung aller Protonenresonanzfrequenzen erfolgte nach Standardprozeduren auf der Basis von COSY (Korrelationsspektroskopie), TOCSY (vollständige Korrelationsspektroskopie) und NOESY (Spektroskopie mit Kern-Overhauser-Effekt und Austausch) Spektren (Tabelle 8). Dabei dienten die sequentiellen NH(i)-NH(i+1), C α H(i)-NH(i+1) und C β H(i)-NH(i+1) NOE Crosspeaks der positionsspezifischen Zuordnung einzelner Aminosäuren im Gesamtmolekül. In Abb. 19 sind ausgewählte sequentielle NH(i)-NH(i+1) NOE Crosspeaks im Amidbereich des NOESY-Spektrums markiert.

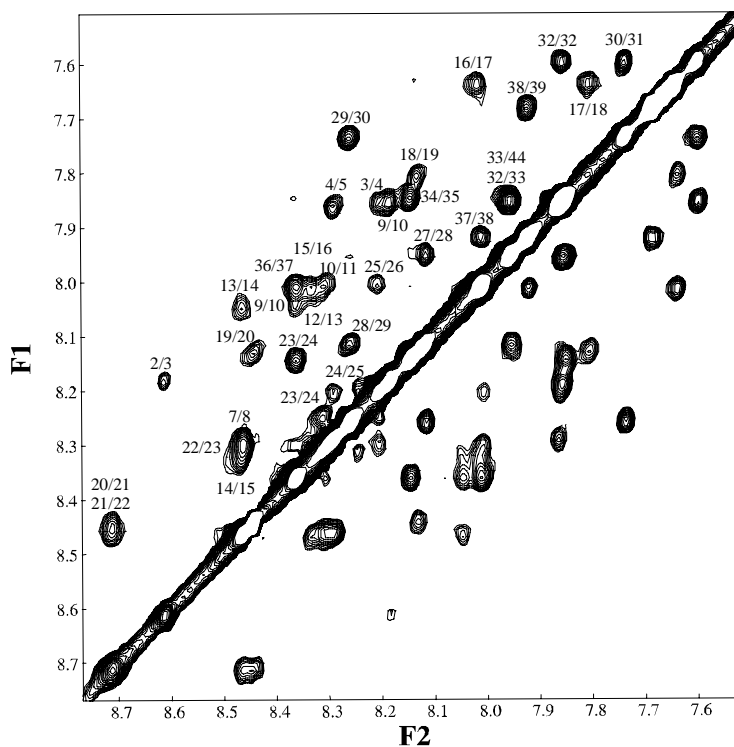


Abb. 19. NH-NH Bereich des 600 MHz NOESY Spektrums in 80% TFE/20% Wasser bei 300K.

Tabelle 8. Zuordnung der Spinsysteme des A β (1-42)

AS ¹	Chemische Verschiebung (ppm)							
	NH	C α H	C β H	C γ H		Andere		
D1		4.2480	2.9850	3.0820				
A2	8.5600	4.2440	1.3750					
E3	8.1340	4.1280	2.0310	2.0700	2.4030*			
F4	7.8050	4.4280	3.1030	3.1910	7.1900	7.1500		
R5	8.2410	4.0460	1.7980	1.9210	1.5890	1.6200	3.1510 7.1500	
H6	8.2380	4.5270	3.2480	3.3220			7.2550	
D7	8.4140	4.6730	2.9100*					
S8	8.2460	4.2570						
G9	8.3100	3.9980*						
Y10	7.9540	4.2480	3.1140	3.1140			6.7140 7.0470	
E11	8.2590	4.0790	2.2920*		2.5720*			
V12	8.3130	3.7420	2.1050		1.0560	0.8980		
H13	7.9980	4.2340	3.2650*				7.2460	
H14	8.4160	4.2030	3.2800*				7.1660	
Q15	8.2860	3.9070	2.1390	2.2270	2.3350*		6.2630 6.5390	
K16	7.9680	4.0600	1.9510		1.4700		1.6590 2.9020	
L17	7.5900	4.2060	1.7170	1.4720	1.6950		0.8420	
V18	7.7550	3.5950	2.0240		0.8320*			
F19	8.0840	4.3350	3.2130*				7.1650 7.246	
F20	8.4050	4.2480	3.3000*					
A21	8.6610	3.9300	1.5330					
E22	8.4100	4.0890	2.0750	2.1900	2.4070	2.6320		
D23	8.2570	4.4540	2.7760	2.7760				
V24	8.2040	3.6940	1.8700		0.6980	0.7950		
G25	8.1560	3.8360	3.8650					
S26	7.9580	4.3530	3.9900*					
N27	7.9060	4.7230	2.8320	2.9050			6.4310 7.2890	
K28	8.0680	4.1310	1.8670	1.9080	1.4680	1.5290	1.6700 2.9700	
G29	8.2090	3.8390*						
A30	7.6870	4.2100	1.4680					
I31	7.5510	3.9280	1.9830		1.2590	0.9550	0.8750	
I32	7.8020	4.2140	1.9100		1.2370	0.9100	0.8650	
G33	7.9060	3.8420	3.8080					
L34	7.8050	4.2250	1.6100*				0.8630*	
M35	8.0960	4.3200	2.1370	2.2710	2.5320	2.7130		
V36	8.3120	4.0000	2.1970		0.9440	1.0140		
G37	7.9610	3.8730	3.9310					
G38	7.8700	3.9360*						
V39	7.6350	4.0610	2.1230		0.9080	0.9440		
V40	7.6000	4.0680	2.0590		0.9060	0.9380		
I41	7.6300	4.3410	1.3980		0.9580*			
A42	8.4420	4.2540	1.3390					

¹ Aminosäure; * degenerierte chemische Verschiebungen

Die Ermittlung der Sekundärstruktur von A β (1-42) basierte auf der Interpretation nichtsequentieller NOE Crosspeaks sowie auf der Analyse von chemischen Verschiebungen der C α -Protonen. So wurden für α -Helices typische C α H(i)-NH(i+3), C α H(i)-NH(i+4) und C α H(i)-C β H(i+3) NOEs, die sich aus der räumlichen Nähe benachbarter Helixwindungen ergeben, ausschließlich in den beiden Peptidsegmenten Glu11-Val24 und Lys28-Val36 gefunden. Dieses Ergebnis helikaler Sekundärstruktur in zwei Peptidsegmenten konnte eindeutig durch Hochfeldverschiebungen von C α -Protonen im Vergleich zu tabellierten "random coil" Werten (Wishart *et al*, 1995) bestätigt werden, wenn das Kriterium für die Sekundärstruktur-Zuordnung mit dem Wert von <-0,1 ppm für mindestens drei in der Primärsequenz aufeinanderfolgende Aminosäuren vorausgesetzt wird. In Abb. 20 A sind die Differenzen von chemischen Verschiebungen zwischen gemessenen und tabellierten "random coil" Werten von C α -Protonen aufgetragen. Interessanterweise kann aus der Analyse der chemischen Verschiebungen auch für das N-terminale Segment Glu3-His6 die Existenz einer helikalen Windung vorhergesagt werden, was sich durch entsprechende NOEs zwischen Glu3 und His6 bzw. Asp7 aber nicht bestätigen läßt. Die Berechnung der 3D-Struktur in Lösung basiert auf einer quantitativen Auswertung der NOEs, also der Umrechnung von NOE-Peak-

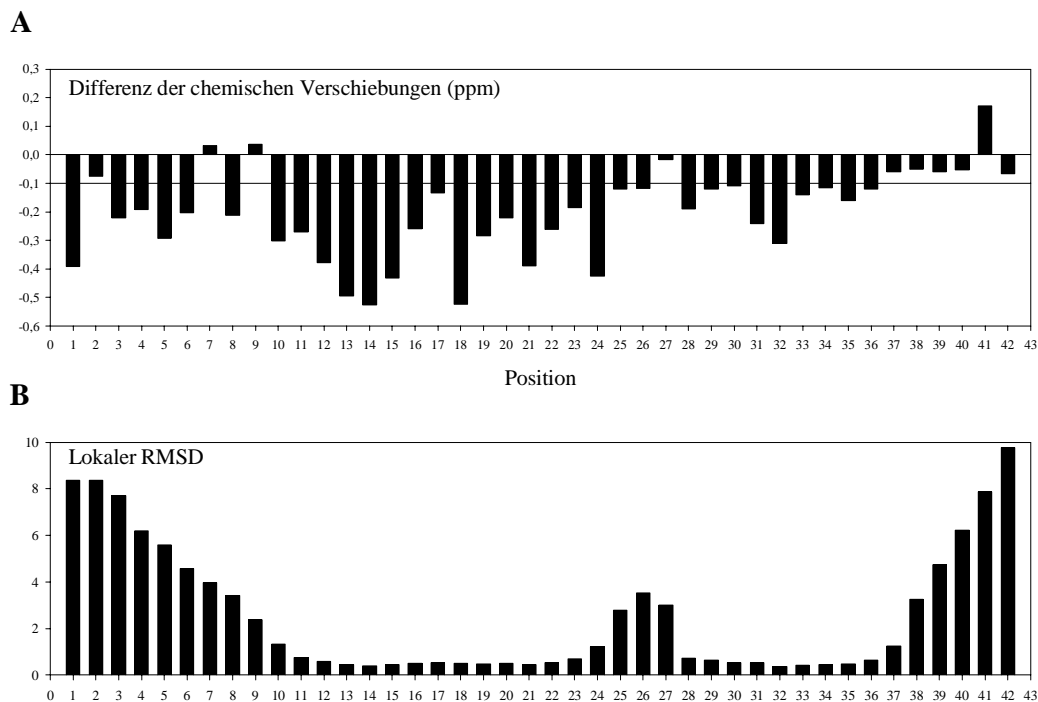


Abb. 20. (A) Differenzen zwischen gemessener chemischer Verschiebung der C α -Protonen und tabellierten "random coil" Werten, (B) lokaler RMSD von 15 berechneten Strukturen im Vergleich zu gemittelten Strukturkoordinaten.

intensitäten in Abstandsinformationen und der Einbeziehung von $^3J_{\text{NH-aH}}$ Kopplungskonstanten. Die dabei ermittelten 287 Interprotonenabstände und Winkelrestriktionen gingen als experimentelle Vorgaben in Distanzgeometrie-Berechnungen mit dem Ziel ein, 50 zufällige Konformationen als Startstrukturen für *simulated annealing* (SA, simuliertes Tempern) Prozeduren zu erzeugen. Das Ergebnis der SA-Berechnungen ergab für A β (1-42) 15 Strukturen, die frei von Distanzverletzungen größer als 0.03 Å und Verletzungen von Diederwinkeln $>1^\circ$ waren (Tabelle 15, siehe 4.2.8.). Die gute strukturelle Übereinstimmung der 15 Konformationen drückt sich in *root mean square deviation* (RMSD, Wurzel der mittleren Fehlerquadrate) von 0.6 Å für die Rückgratatome N, Ca, C' in den Peptidsegmenten Glu11-Val24 und Lys28-Val36 aus (Abb. 20 B). Damit bestätigen die Ergebnisse der SA-Berechnungen, die bereits sowohl aus der Analyse der chemischen Verschiebung als auch aus der Existenz der NOEs gezogenen Schlußfolgerungen hinsichtlich der Stabilisierung helikaler Sekundärstrukturen in den Peptidsegmenten Glu11-Val24 und Lys28-Val36. Wie Abb. 21 zeigt, kann die Sekundärstruktur von A β (1-42) darüber hinaus mit flexiblen N- und C-Termini (Asp1-Tyr10, Gly37-Ala42) sowie einer flexiblen Linkerregion Gly25-Ser26-Asn27 zwischen den beiden Helices charakterisiert werden.

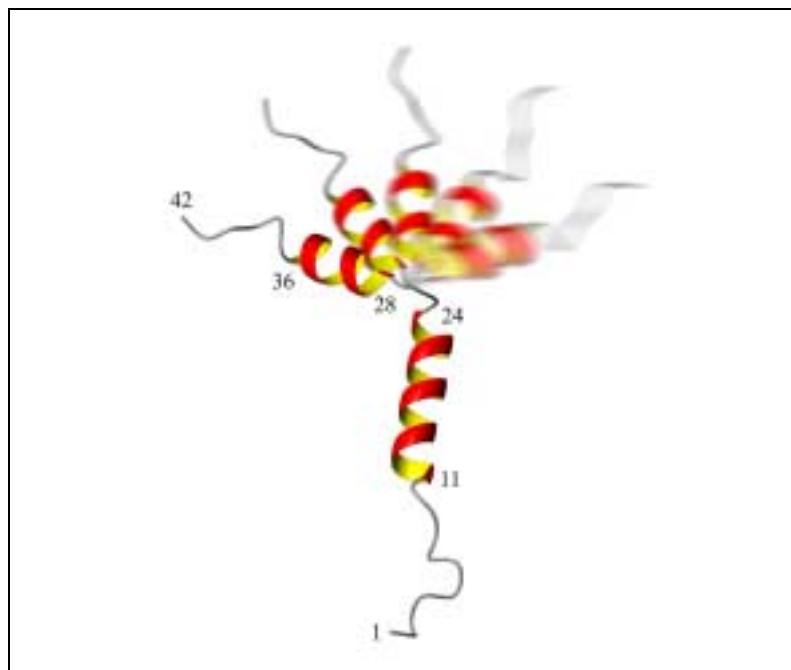


Abb. 21. Schematische Ribbondarstellung von A β (1-42) generiert mit MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996). Zur Verdeutlichung der flexiblen Linkerregion zwischen den zwei Helices ist die C-terminale Helix mit verschiedenen Orientierungen dargestellt.

Das vorliegende Ergebnis korreliert sehr gut mit anderen NMR-Studien, die zwei stabile α -Helices im Sequenzbereich Gln15-Asp23 und Ile31-Met35 in 40% TFE für A β (1-40) (Sticht *et al.*, 1995) bzw. Gln15-Val24 und Lys28-Val36 in mizellarem SDS für A β (1-40) und A β (1-42) lokalisiert haben (Coles *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 1999). Die gefundenen Differenzen in den Längen der Helices können durch die unterschiedlichen strukturstabilisierenden Lösungsmittel erklärt werden (40% TFE bzw. mizellares SDS versus 80% TFE). Darüber hinaus stützt die gefundene, potentiell helikale Domäne im N-terminalen Bereich des Peptides (Glu3-His6) Ergebnisse von NMR-Studien des Fragments A β (1-28) in 60% TFE (Barrow & Zargorski, 1991). Insgesamt besteht eine gute Übereinstimmung zwischen der nach Chou-Fasman vorhergesagten Struktur und den experimentell in unterschiedlicher Lösungsumgebung erhaltenen Konformationsvorstellungen von A β (Abb. 22). Das unterstreicht, daß durch den Zusatz Struktur-stabilisierender Lösungsmittel die intrinsische Neigung der A β -Sequenz zur Ausbildung α -helikaler Strukturanteile unterstützt wird. Die Stabilisierung einer monomeren, α -helikalen Struktur des A β könnte unter physiologischen Bedingungen stattfinden, wenn das Peptid im humanen Plasma oder in der Cerebrospinalflüssigkeit an Lipoproteine, Albumin, ApoJ, α 2-Makroglobulin oder Transthyretin bindet

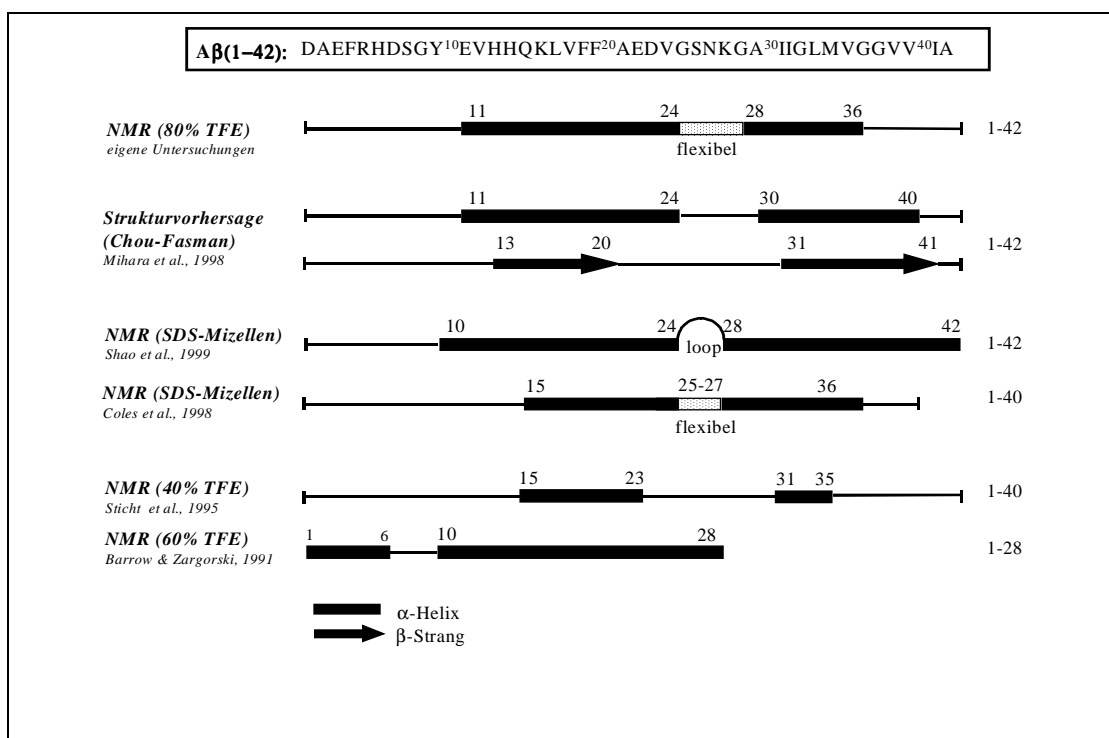


Abb. 22. Konformation von A β -Peptiden.

(Schwarzman *et al.*, 1994; Matsubara *et al.*, 1995; Biere *et al.*, 1996.; Du *et al.*, 1998). Mit FTIR-mikrospektroskopischen Untersuchungen am Synchrotron konnte gezeigt werden, daß A β in der grauen Substanz des Gehirns signifikante Anteile von α -helikaler Struktur aufweist (Choo *et al.*, 1996).

2.2.3. $\alpha \rightarrow \beta$ Übergang

Die durch die D-Aminosäure-Substitutionen ausgelösten konformationellen Veränderungen wurden mittels CD- und FTIR-Spektroskopie untersucht. Die CD-Studien zeigen (Abb. 23), daß es möglich ist, die α -helikale Konformation des A β (1-42) positionsspezifisch zu destabilisieren. Während die meisten D-Analoga (z.B. D-5/6) ihre Konformation nicht ändern und α -helikal bleiben, wird durch die D-Aminosäure-Substitution im zentralen Bereich der Sequenz (17-21) die Helizität der Peptide deutlich reduziert und gleichzeitig der Übergang in eine β -Faltblattstruktur induziert. Kennzeichnend hierfür sind der Übergang des Doppelminimums bei 208 und 222 nm in ein Minimum um 215-218 nm sowie die Intensitätsreduzierung des Maximums bei 190 nm.

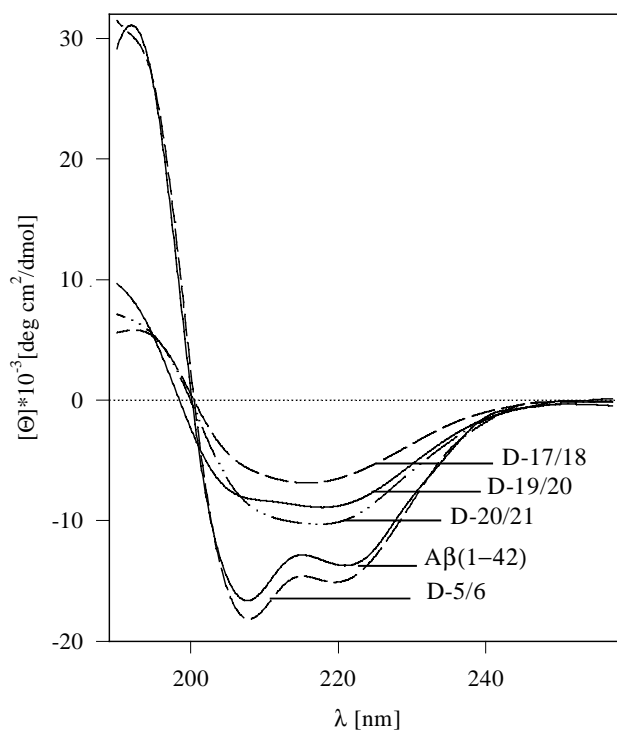


Abb. 23. Effekt von D-Aminosäure-Substitutionen auf die Helixstabilität von A β (1-42). CD-Spektren ausgewählter D-Analoga in 80% TFE/ 20% Wasser (v/v) bei einer Peptidkonzentration von 2×10^{-5} M.

Im Unterschied zur CD-Spektroskopie können über FTIR-Untersuchungen β -Faltblattstrukturen separat detektiert werden. Das gesamte D-Aminosäure-Substitutionsset wurde deshalb mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse, die mit den CD-Untersuchungen konsistent sind, verdeutlichen, daß ein $\alpha \rightarrow \beta$ Übergang von A β (1-42) durch positionsspezifische D-Aminosäure-Substitution ausgelöst werden kann. Die FTIR-Spektren des A β (1-42) und der meisten D-Analoga sind durch eine für α -helikale Strukturen typischen Amid-I-Bande bei 1654 cm^{-1} dominiert (Abb. 24 A). Die IR-Spektren derjenigen D-Analoga, die Substitutionen innerhalb der Helix I enthalten (außer D13/14 und D-15/16), besitzen neben der α -Strukturbande eine zusätzliche Bande bei einer Wellenzahl von 1634 cm^{-1} , die die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen anzeigt. Wird das Verhältnis von β - und α -Strukturbande aufgetragen, so ergibt sich ein Profil (Abb. 24 B), woraus abgeleitet werden kann, daß die Destabilisierung der Helix I (11-24) durch die Substitution in den Positionen 17-24 (LVFFAEDV), sowie mit einem geringeren Effekt in den Positionen 10-12 (YEV) die

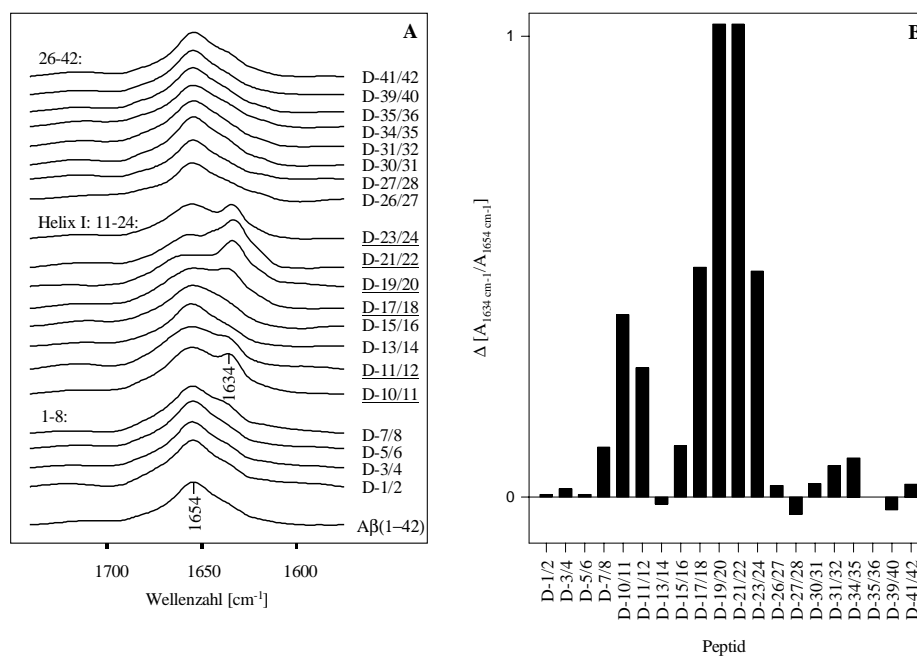


Abb. 24. Auslösung eines $\alpha \rightarrow \beta$ Überganges durch positionsspezifische D-Aminosäure-Substitutionen im A β (1-42). (A) FTIR-Spektren in der Amid-I-Region nach Fourier-Dekonvolution des A β (1-42) D-Aminosäure-Substitutionssets in 80% TFE-d1/20% D₂O bei einer Peptidkonzentration von $4,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, (B) Verhältnis von β - und α -Strukturbande.

Ausbildung von β -Faltblattstrukturen initiiert. Der schwache Einfluß der Substitutionen im Bereich 13 bis 16 (HHQK) kann durch das unterschiedliche Potential der einzelnen D-Aminosäuren zur Helixdestabilisierung erklärt werden. Wie anhand eines α -helikalen Peptidmodells gezeigt wurde, führt z.B. die Substitution von Val/Val gegen D-Val/D-Val im Vergleich zu His/His gegen D-His/D-His zu einem deutlich verringerten Destabilisierungseffekt, der sich in einer entsprechenden Änderung der freien Energie von 7.1 kJ/mol bzw. 1.6 kJ/mol bemerkbar macht (Krause *et al.*, 2000).

Sowohl über CD als auch FTIR-Spektroskopie konnte somit nachgewiesen werden, daß das Potential für die Auslösung eines $\alpha \rightarrow \beta$ Übergangs von A β (1-42) innerhalb der Helix I (11-24) liegt. Weder die Helix II (28-36) noch der N- und C-Terminus des Peptides spielen eine Rolle für den konformationellen Übergang des Alzheimer-Peptides in eine β -Faltblattstruktur. Dieses Ergebnis steht in Korrelation zu früheren Studien, die mit verkürzten A β -Peptiden durchgeführt wurden. Während das C-terminale Fragment A β (29-42) unabhängig von pH und Temperatur stets β -faltblattstrukturiert ist, kann das N-terminale Peptid A β (1-28) in Abhängigkeit von der Lösungsumgebung seine Konformation verändern (Barrow & Zargorski, 1991; Barrow *et al.*, 1992, Zargorski & Barrow, 1992). Den stärksten Effekt auf die Helix-Destabilisierung von A β (1-42) und damit auf den Übergang in eine β -Faltblattstruktur hatten die D-Aminosäure-Substitutionen im Bereich 19-22. Exakt in dieser Region sind die beiden Punktmutationen Ala21 \rightarrow Gly (*Flemish type*) und Glu22 \rightarrow Gln (*Dutch type*) von A β lokalisiert. Daß diese Mutationen tatsächlich die Sekundärstruktur von A β destabilisieren und den Übergang in eine β -Faltblattstruktur einleiten, konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden. Die Substitution Ala21 \rightarrow Gly fördert in TFE den Übergang des Fragments A β (19-35) von einer α -helikalen in eine β -faltblattstrukturierte Konformation (El-Agnaf *et al.*, 1998). Diese konformationelle Veränderung hat weitgehende Konsequenzen. Sie reduziert, vermutlich aufgrund einer fehlenden Substraterkennung, die Spaltung zwischen den Aminosäureresten 16 und 17 der A β -Region von A β PP durch die α -Sekretase und erhöht damit die Freisetzung von A β (Lammich *et al.*, 1999). Durch die Mutation Glu22 \rightarrow Gln wird entsprechend der Chou-Fasman Sekundärstrukturvorhersage (Chou & Fasman, 1978) die Stabilität der zentralen α -helikalen Region von A β verringert. Es konnte gezeigt werden, daß sie zu einem Konformer mit deutlich erhöhtem β -Faltblattstruktur-Anteil führt (Fabian *et al.*, 1993a). Im Unterschied

dazu resultiert eine Helix-Stabilisierung von A β (1-40) durch die Substitution von Val18→Ala in einem Analogon mit verminderten amyloiden Eigenschaften. Die Bedeutung der Aminosäure-Region 11-24 von A β (1-42) wird durch die Interaktion des Peptides mit Molekülen, wie ApoE, Glycoaminoglycanen oder Nikotin, die die Amyloid-Bildung beeinflussen, unterstrichen. ApoE bindet innerhalb des Sequenzabschnittes 12-28 von A β (Ma *et al.*, 1994). In TFE induziert es dadurch einen α → β -Übergang von A β (1-40) (Soto *et al.*, 1996). Glycoaminoglycane binden an die Domäne 12-17 (Brunden *et al.*, 1993). Sie fördern wie auch das ApoE die Amyloid-Bildung von A β . Im Gegensatz dazu inhibiert Nikotin die Fibrillenbildung von A β . Es bindet an eine α -helikale Domäne innerhalb der Region 1-28, und verhindert daher vermutlich einen α → β Übergang von A β (1-42) (Salomon *et al.*, 1996).

2.2.4. Assoziationsverhalten

Um nachzuweisen, daß der durch die D-Aminosäure-Substitutionen ausgelöste α → β Übergang auch unter den angewendeten Bedingungen zur Peptidaggregation unter Ausbildung von Amyloid-Fibrillen führt, wurden Lichtstreuungsexperimente, Untersuchungen mit Thioflavin T, elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie Experimente zur Inhibierung der Amyloid-Bildung durchgeführt.

Lichtstreuungsexperimente. Mit Hilfe von statischer und dynamischer Lichtstreuung wurden die relative Streuintensität I_{rel} und die Verteilung der Stokes-Radien R_s bestimmt. Beide Werte können dazu genutzt werden, um das Assoziationsverhalten der Peptide zu beschreiben. Da schon Spuren großer Partikel das Ergebnis verfälschen können, ist eine Filtration der Probe notwendig. Das Sedimentieren solcher Partikel war nicht möglich, da es aufgrund der hohen Dichte der 80% TFE/20% Wasser-Lösung zur Flotation der gelösten Bestandteile kam. Da in Betracht gezogen werden mußte, daß durch die Filtration (100 nm) auch ein Teil der hochmolekularen Assoziante abgetrennt wird, wurde die Peptidkonzentration vor und nach der Filtration spektralphotometrisch bestimmt. Die Ausgangskonzentration der Peptide entsprach in allen Fällen 1 mg/ml. Die Auswirkung der Filtration ist in Tabelle 9 dargestellt. Im Fall der Analoga D-19/20 und D-21/22 wurden rund 50% der Peptide durch den Filter zurückgehalten, was zeigt, daß durch den α → β Übergang eine starke Assoziation

Tabelle 9. Assoziationsverhalten von A β (1-42) und ausgewählten D-Analoga in 80% TFE/20% Wasser (v/v).

Peptid	Filtrationsschritt ¹	Dynamische Lichtstreuung der filtrierten Probe	
	Anteil zurückgehaltener Assoziate [%]	I _{rel}	R _{S, Ass.} [nm]
A β (1-42)	0	0,4	21
D-1/2	5	3,0	22
D-11/12	0	0,8	14
D-17/18	12	2,8	17
D-19/20	44	12,1	29
D-21/22	53	12,1	24
D-23/24	3	6,3	19
D-34/35	0	4,4	20

¹Filter mit 100 nm Porengröße

ausgelöst wird. Auch für das Analogon D-17/18 konnte ein Anteil hochmolekularer Assoziate gefunden werden. Dieser zeigt aber mit 12% ein geringeres Ausmaß der Assoziation an. Im Vergleich dazu konnten für das unmodifizierte A β (1-42) keine hochmolekularen Assoziate nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Assoziationsverhalten der A β -Peptide konnte durch die Lichtstreuungsexperimente bestätigt werden. Die relative Streuintensität ist im Vergleich zum A β (1-42) bei den D-Analoga mit Substitutionen in den Positionen 19-24 stark erhöht (Tabelle 9), was einen Hinweis auf Assoziate in den filtrierten Proben liefert. Interessanterweise zeigt das Analogon D-11/12 keine erhöhte Streuintensität, obwohl es ebenfalls einen schwachen $\alpha \rightarrow \beta$ Übergang durchläuft (vgl. Abb. 24). Die Größenverteilung der Partikel zeigt für alle Peptide zwei Hauptradien, $R_S = 1.1 \pm 0.1$ nm, der die Monomere repräsentiert, und $R_{S, Agg} = 19 \dots 29$ nm (Tabelle 9), dem durchschnittlichen hydrodynamischen Radius der Peptidassoziate. Die entsprechende Peakfläche a_A in der Größenverteilung korreliert dabei mit den Intensitäten I_{rel} . Der Aggregatanteil im Filtrat wurde exemplarisch für A β (1-42) als unmodifiziertes Peptid zu 0% und für das am stärksten assoziierende Analogon D-21/22 zu 30% abgeschätzt.

Die Ergebnisse der Lichtstreuung korrelieren sehr gut mit dem konformationellen Verhalten der D-Aminosäure-substituierten Analoga des A β . Den stärksten Effekt auf die Konformation und Assoziation von A β (1-42) zeigte die Strukturstörung im Bereich der Aminosäuren ¹⁹FFA²²E, also jener Region, in der die natürlich vorkommenden Punktmutationen Ala21→Gly und Glu22→Gln lokalisiert sind. Neben diesen Mutationen wurden auch Modifikationen, wie z.B. Razemisierungen und Isomerisierungen, beschrieben, die die Aggregation des Peptides beschleunigen (Tomiya *et al.*, 1994, Fukuda *et al.*, 1999). Während die Razemisierung bzw. Isomerisierung von Asp23 in A β (1-35) und A β (1-42) das Aggregationsverhalten stark beeinflusst, bewirkt die entsprechende Modifizierung von Asp7 kaum einen Effekt. Mit den vorliegenden Ergebnissen können diese Studien bestätigt werden. Erhöhte Mengen an razemisiertem und isomerisiertem Aspartat wurden in isolierten cerebralen und vaskulären Alzheimer-Plaques gefunden (Shapira *et al.*, 1988; Roher *et al.*, 1993). Obwohl die Bildung von D-Aminosäuren mit der Alterung von Proteinen zunimmt (Bada, 1984) und daher eine Modifizierung des langlebigen Alzheimer-Peptides wahrscheinlich erst nach der Amyloid-Bildung stattfinden könnte, wird durch die vorliegenden Ergebnisse unterstrichen, daß sie direkt den konformationellen Übergang in die β -Faltblattstruktur auslösen und dadurch die Amyloid-Bildung beschleunigen kann.

Thioflavin T Anfärbeuntersuchungen. Um nachzuweisen, daß die Peptidassoziation zur Bildung amyloider Strukturen führt, wurde der Thioflavin T (ThT) Fluoreszenz Assay durchgeführt. Dieser Assay beruht darauf, daß die spezifische Bindung des Farbstoffes an Amyloid-Fibrillen zu einer Verschiebung des Anregungs- und Emissionsmaximums führt und somit die Bildung von Amyloid-Fibrillen sehr gut beobachtet werden kann (Naiki *et al.*, 1989; LeVine, 1993). Für die Untersuchungen wurden das D-Analogon D-21/22, das das stärkste Assoziationsverhalten gezeigt hat, und das unmodifizierte A β (1-42) ausgewählt. Erwartungsgemäß konnte keine Wechselwirkung zwischen dem monomeren A β (1-42) und ThT festgestellt werden (1.8 Fluoreszenz-Einheiten). Im Unterschied dazu zeigte D-21/22 eine starke ThT-Bindung (747 Fluoreszenz-Einheiten), die auf die Bildung fibrillärer Assoziate zurückgeführt werden kann.

Elektronenmikroskopie. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten den fibrillären Charakter der Peptidaggregate bestätigen (Abb. 25). Die unverzweigten Fibrillen sind durchschnittlich 9 nm breit und 100 nm bis $>1\mu\text{m}$ lang. Sie entsprechen in ihrem Aussehen und ihrer Dimension natürlichen Amyloid-Fibrillen (Rochet & Lansbury, 2000).

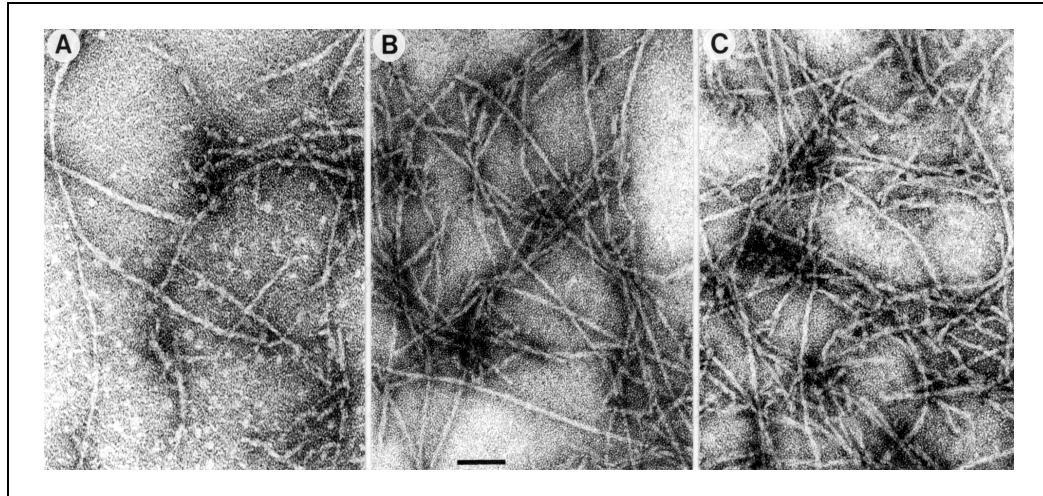


Abb. 25. (A-C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ kontrastierten Fibrillen (2% wäßriges Uranylacetat) des A β (1-42)-Analogon D-21/22 (1mg/ml) aus 80% TFE/20% Wasser. Balken, 100 nm.

Inhibierung der Amyloid-Bildung. Die Amyloid-Bildung konnte durch einen von Soto *et al.* (1998) beschriebenen peptidischen Inhibitor zurückgedrängt werden. Das als iA β 5 bezeichnete Peptid (LPFFD) leitet sich sequentiell von der zentralen A β -Domäne L¹⁷VFFA²¹ ab. Prolin fungiert in der Inhibitorsequenz als strukturbrechende Aminosäure. Der Inhibitor konnte im 10-fachen molaren Überschuß die Fibrillenbildung von D-21/22 (1mg/ml) in 80% TFE um 31% verringern. Dieser inhibitorische Effekt ist vergleichbar mit den Untersuchungen von Soto *et al.*, die zeigen konnten, daß ein 20-facher molarer Überschuß in 0.1 mM Tris (pH 7,4) die Fibrillenbildung von A β (1-42) (0.5 mg/ml) nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C um 71.9 % inhibiert. Der Nachweis, daß es in einer artifizialen Umgebung wie TFE gelingt, ähnliche inhibitorische Effekte wie unter physiologischen Bedingungen zu erzielen, läßt darauf schließen, daß der ausgelöste $\alpha\rightarrow\beta$ Übergang von A β mit der Bildung relevanter fibrillärer Strukturen verbunden ist.

2.2.5. Schlußfolgerungen

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Konformations- und Assoziationsexperimente haben gezeigt, daß der strukturelle Übergang des Alzheimer-Peptides A β in eine amyloide β -Faltblattstruktur durch eine lokale Störung der Konformation des Peptides ausgelöst werden kann. Obwohl A β (1-42) in 80% TFE/20% Wasser (v/v) in zwei separate Helices faltet (Helix I: Glu11-Val24; Helix II: Lys28-Val36), führt nur die Destabilisierung der Helix I in den Positionen 17-24 zum Konformationswechsel in eine β -Faltblattstruktur. Dieser Übergang ist unmittelbar mit der Assoziation des Peptides und der Bildung von Amyloid-Fibrillen verbunden. Der hydrophobe Charakter der Region ¹⁷LVFFAED²⁴V unterstreicht, daß sowohl konformationelle Veränderungen als auch hydrophobe Wechselwirkungen wichtige Triebkräfte bei der Auslösung der Amyloid-Bildung sind. Die Schlüsselrolle dieser Domäne für den Assoziationsprozeß von A β ist bereits beschrieben worden (Hilbich *et al.*, 1992; Fraser *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1995; Esler *et al.*, 1996; Tjernberg *et al.*, 1996). Die vorliegenden Ergebnisse weisen jedoch zum ersten Mal am Gesamtmolekül nach, daß die konformationelle Stabilität dieser Region direkt den Strukturübergang des Alzheimer-Peptides steuert.

Die Beschleunigung der Amyloid-Bildung von A β durch eine Vielzahl von Faktoren, wie Mutationen vom *Flemish* und *Dutch type* (Hendriks *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1990), Isomerisierung und Razemisierung (Tomiyama *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1999), pH-Wert Veränderungen (Barrow & Zargorski, 1991), Glycoaminoglycane (Brunden *et al.*, 1993), pathologische Chaperone wie ApoE und Antichymotrypsin (Ma *et al.*, 1994) oder Zink-Ionen (Bush *et al.*, 1994) könnte daher durch eine direkte Einflußnahme auf die Stabilität der zentralen Helix zurückzuführen sein.