

Proteinfaltung

Switch-Peptide in statu nascendi: Induktion von Konformationsübergängen und deren Bedeutung in degenerativen Erkrankungen**

Manfred Mutter,* Arunan Chandravarkar, Christine Boyat, John Lopez, Sonia Dos Santos, Bhubaneswar Mandal, Richard Mimna, Karine Murat, Luc Patiny, Lydiane Saucède und Gabriele Tuchscherer

Konformationsübergänge sowie Faltung und Fehlfaltung von Peptiden und Proteinen spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen und sind daher zu einem wichtigen Forschungsgebiet im Grenzbereich von Chemie, Biologie und Medizin geworden.^[1] Konformationsänderungen spielen in löslichen Amyloid- β -Vorstufen, die zu einer aggregierten β -Faltblattstruktur führen, eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von zerebralen Amyloidablagerungen. Diese sind für Alzheimer-Erkrankungen charakteristisch.^[2] Auch die physiologische PrP^c-Form des Prionenproteins wandelt sich wohl durch den Übergang von einer α -Helix- zu einer β -Faltblattstruktur in die pathologische PrP^{sc}-Form um.^[3] Oligo- und Polypeptide mit ausgeprägter Tendenz zur Bildung von β -Faltblattstrukturen neigen stark zu irreversibler Selbstaggregation – wegen der engen Verknüpfung von Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und den physikochemischen Eigenschaften dieser Peptide macht dies ihre Untersuchung besonders schwierig.^[1] Die Bildung von β -Faltblattstrukturen und Fibrillen bei degenerativen Erkrankungen ist daher kaum untersucht. Die detaillierte Aufklärung der Strukturnucleation und -inhibierung ist deshalb eine schwierige Aufgabe und hat bis heute oft zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt.

Ausgehend von bekannten Methoden, mit denen unterschiedliche Peptidstrukturen und -funktionen induziert und unterbrochen werden können,^[5–7] stellen wir hier eine neue Klasse von „Switch-Peptiden“^[8] vor. Diese erlaubt die Untersuchung des dynamischen Faltungsprozesses vom Moment der Strukturbildung, d.h. „in statu nascendi“ (ISN) des Moleküls, bis hin zur vollständigen Bildung der β -Faltblattstruktur. Die Switch-Peptide sind modular aus drei Segmenten aufgebaut (Abbildung 1): einer Einheit zur Konformationsinduktion (σ), einem Schaltelement (S) und einem Zielpeptid (P, je nach Anwendung auch Wirt-Peptid,

[*] Prof. M. Mutter, Dr. A. Chandravarkar, Dr. C. Boyat, Dr. J. Lopez, Dipl.-Chem. S. Dos Santos, Dipl.-Chem. B. Mandal, Dipl.-Chem. R. Mimna, Dipl.-Chem. K. Murat, Dr. L. Patiny, Dipl.-Chem. L. Saucède, Dr. G. Tuchscherer
Institute of Chemical Sciences and Engineering (ISIC)
Federal Institute of Technology, EPFL-BCH
1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-693-9415
E-mail: manfred.mutter@epfl.ch

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Wir danken Prof. Klaus Müller (Hoffman-LaRoche, Basel, Schweiz) für die Probe des Ncap-Peptidmimetikums.

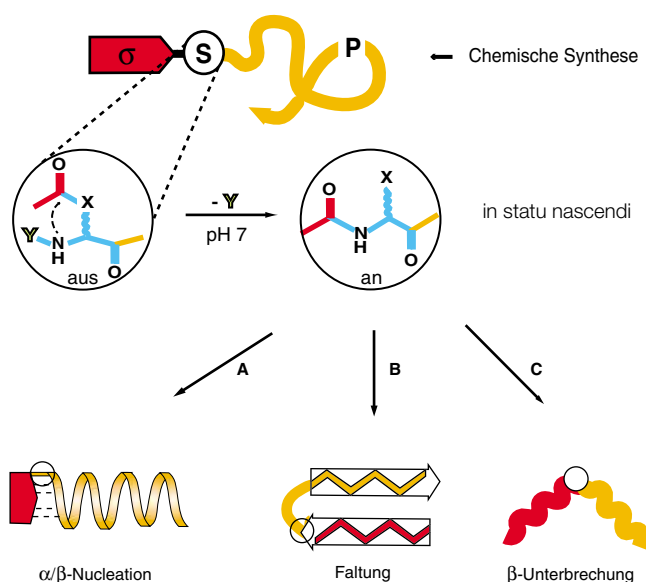


Abbildung 1. ISN-induzierte Konformationsübergänge: Die durch Abspaltung von **Y** (enzymatisch oder durch pH-Änderung) ausgelöste $X \rightarrow N$ -Acylwanderung führt zur Bildung einer Peptidbindung zwischen σ und **P** und induziert damit gleichzeitig einen Konformationsübergang von einer flexiblen, ungeordneten S_{aus} - zu einer gefalteten S_{an} -Struktur. Unter Verwendung von Peptidmimetika und Templatmolekülen können Konformationsübergänge durch die σ -induzierte Nucleation (A), Induktion (B) oder Zerstörung (C) von Sekundär- und Tertiärstrukturen untersucht werden.

Ligand-Peptid oder natives Peptid genannt). Durch die intramolekulare $X \rightarrow N$ -Wanderung ($X = O, S$) eines Acylrestes wird in situ der induktive Effekt von σ auf das Zielpeptid **P** eingeschaltet.

Der Mechanismus von Acyltransfer-Reaktionen wird schon lange intensiv untersucht.^[9,10] Sie spielen eine Rolle bei der Proteinbiosynthese, dem Proteinsplicing,^[9,11] der Peptidsynthese, der Peptidsolubilisierung,^[12] beim Entwurf von Prodrugs^[13] und nativen chemoselektiven Verknüpfungsreaktionen.^[9,14]

Der Einsatz von in situ induzierten intramolekularen $X \rightarrow N$ -Acyltransfer-Reaktionen als Auslöser von Konformationsübergängen und funktionalen Eigenschaften bietet einige Vorteile:

- Die „Switch-Peptide“, welche $N(Y)$ -geschützten O/S -Acylisozeptiden (O/S -Peptide^[15]) entsprechen, können relativ leicht synthetisiert werden^[16] und sind sehr stabil und gut löslich in wässrigen Pufferlösungen. Polare oder geladene Gruppen im Schaltelement **S** erleichtern die Reinigung der Peptide.
- Die Einführung eines **S**-Elements durch flexible, nicht-peptidische Bindungen unterbricht das H-Brückenbindungsmuster im Amidrückgrat und damit den Einfluss der Induktionseinheit σ auf die Konformation des Peptids **P**.^[17] Je nach Zustand von **S** („an“ oder „aus“) liegt das Peptid in zwei deutlich verschiedenen Konformationen mit unterschiedlichen Eigenschaften vor (S_{an} und S_{aus}).

- Für die In-situ-Auslösung des $X \rightarrow N$ -Acyltransfers gibt es eine Reihe von Methoden.^[18] Die von uns verwendeten enzymatisch spaltbaren **N**-Schutzgruppen (**Y**) sind Prototypen für In-vitro- und In-vivo-Anwendungen. Alternativ dazu nutzen wir auch etablierte Methoden zu pH-induzierten Acyltransfer-Reaktionen.^[11a,13]
- Die Bildung der Peptidbindung durch den Acyltransfer, die einer Kinetik 1. Ordnung folgt, löst Konformationsübergänge und damit gekoppelte funktionale Eigenschaften aus.

Das in Abbildung 1 dargestellte Konzept der ISN-Nucleation, -Bildung und -Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstrukturen kann auf Modellpeptide und native Peptidsequenzen mit therapeutischer Bedeutung angewendet werden.

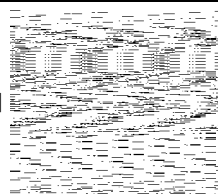
Als Induktionseinheit σ zur ISN-Nucleation von Sekundärstrukturen können Synthesebausteine^[5,19] und Peptidmimetika zur Überwindung der entropisch ungünstigen Nucleationsenergie^[4a] verwendet werden (Strategie A).

Als Prototyp wurde zunächst ein konformativ eingeschränktes Peptidmimetikum (Ncap^[19e]) als Induktionseinheit σ an das Zielpeptid **P** (**1a**, Tabelle 1) gekuppelt. In Abwesenheit des Nucleationeffekts (Entkopplung, S_{aus}) liegt **1a** hauptsächlich in einer ungeordneten Struktur vor (CD-Spektrum, Abbildung 2a). Bei pH 7 wird die $O \rightarrow N$ -Acylwanderung ausgelöst (Migrationshalbwertszeit $t_{1/2} \sim 25$ min, Einschub in Abbildung 2a), und der Ncap-Rest induziert eine Helixbildung (ISN, S_{an} -Zustand). Das Resultat ist ein spontaner Konformationsübergang zur α -Helixstruktur (der prozentuale Helixanteil entspricht dem Grad der Acylwanderung), wie charakteristische Cotton-Effekte im CD-Spektrum belegen. Zum Vergleich wurde das Peptid **1b** mit identischer

Tabelle 1: Synthetisierte Switch-Peptide.

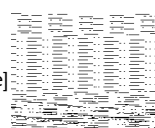
Switch-Peptid	Y	σ	P
1a	H	Ncap ^[bl] -A	(LS) ₃ LG-NH ₂
1b	H	Ac-A	(LS) ₃ LG-NH ₂
11a	H	Ac-(SL) ₂	(LS) ₂ L-NH ₂
11b	Acococ ^[cl]	Ac-(SL) ₂	(LS) ₂ L-NH ₂
11c	pGlu	Ac-(SL) ₂	(LS) ₂ L-NH ₂
11d	Arg	Ac-(SL) ₂	(LS) ₂ L-NH ₂
111a	H	Ac-(SL) ₂ -A β (14–20)	A β (21–24)-SLG-NH ₂ ^[dl]
111b	H	Ac-LSL	NFGAIL-SLSG-NH ₂
IVa	H	Ac-SLS ψ Pro ^[el]	(LS) ₂ LG-NH ₂
IVb	H	Ac- ψ Pro	FFD-NH ₂
IVc	H	Ac-A β ψ Pro	FFD-NH ₂
V	H	Ac-NPY (21–31) ^[fl]	NPY (33–36) ^[gl]

[a] Cys (**IVc**), Thr (**V**). [b]



[c]

[d] HQKLVFFAEDV. [e]



[f] YSALRHYINLI. [g] RQRY.

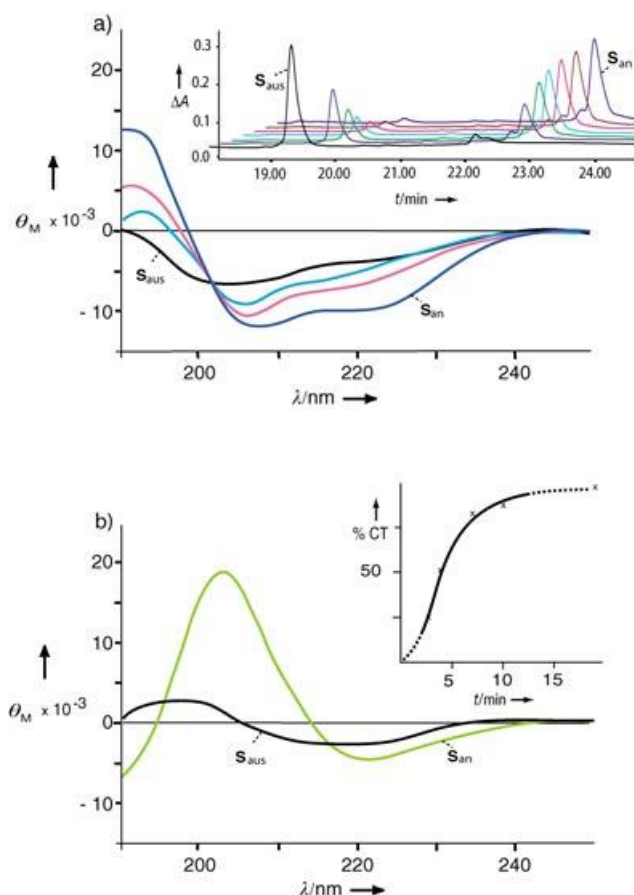


Abbildung 2. ISN-induzierte Konformationsübergänge im CD-Spektrum: a) Durch pH-induzierte Acylwanderung (Einschub: HPL-Chromatogramm des zeitlichen Verlaufs der Acylwanderung) ändert **Ia** seine Konformation und geht von einer ungeordneten (S_{aus}) in eine α -Helixstruktur (S_{an}) über; b) **Ib** zeigt unter identischen experimentellen Bedingungen einen Übergang von einer ungeordneten (S_{aus}) zu einer β -Faltblattstruktur (S_{an}). Einschub: Zeitlicher Verlauf des Konformationsübergangs (CT) von **Ib**. CT: Normalisierte Werte von θ_M bei $\lambda = 218$ nm für S_{aus} (0% CT) und S_{an} (100% CT).

Sequenz, aber mit einer Acetylgruppe als Induktionseinheit σ synthetisiert. Anders als **Ia** zeigt **Ib** bei der Acylwanderung ($t_{1/2} < 5$ min, Einschub in Abbildung 2b) einen Konformationsübergang von einer ungeordneten (S_{aus}) zu einer β -Faltblattstruktur (S_{an} , Abbildung 2b). Der Helix-induzierende Effekt von Ncap überwiegt also die Tendenz der amphiphilen Oligopeptidsequenz (Ser-Leu) $_n$ zur Bildung einer β -Faltblattstruktur.^[20] Die Verwendung verschiedener Synthesebausteine, z. B. topologischer Template, Scaffolds oder Peptidmimetika^[5,19] als Induktionseinheiten für eine In-situ-Umwandlung von Konformationszuständen könnte Werkzeuge zur Umkehrung von Prozessen bei degenerativen Erkrankungen liefern.

Durch Verwendung von σ - und P -Peptidblöcken mit Kettenlängen, die beide unter dem kritischen Wert für Helix- (n_c, α) oder β -Faltblattbildung (n_c, β)^[4,20] liegen, nimmt das entsprechende Switch-Peptid eine ungeordnete Struktur im S_{aus} -Zustand ein. Wird durch gezielte Acylwanderung eine Peptidbindung zwischen σ und P hergestellt (S_{an}), erreicht das Gesamtpeptid die kritische Ketten-

länge zur Sekundärstrukturbildung, und die sequenzabhängige Konformationsumwandlung wird ausgelöst.

Weitere Oligopeptide des Typs (Leu-Ser) $_n$ (**II** in Tabelle 1)^[20a] sowie von Amyloid- β -abgeleitete Sequenzen (**III**)^[2,6] – alle mit hohem Potenzial zur β -Faltblatt- und Fibrillenbildung – wurden hergestellt. CD-, IR- und EM-Studien zufolge unterbricht ein eingebautes Schaltelement **S** die geordneten Strukturen. Beim Auslösen des Acyltransfers durch pH-Änderung werden ISN-induzierte Konformationsübergänge von ungeordneten Strukturen zu β -Faltblattstrukturen beobachtet; gleichzeitig nimmt die Peptidlöslichkeit deutlich ab (Abbildung 3a, Abbildung 4a).^[5,19] Ein Referenzpeptid von **Ila** mit unter diesen Bedingungen nicht abspaltbarer N-Schutzgruppe ($Y = Ac$) zeigt eine pH-unabhängige, ungeordnete Struktur. Dies bestätigt, dass der beobachtete Kon-

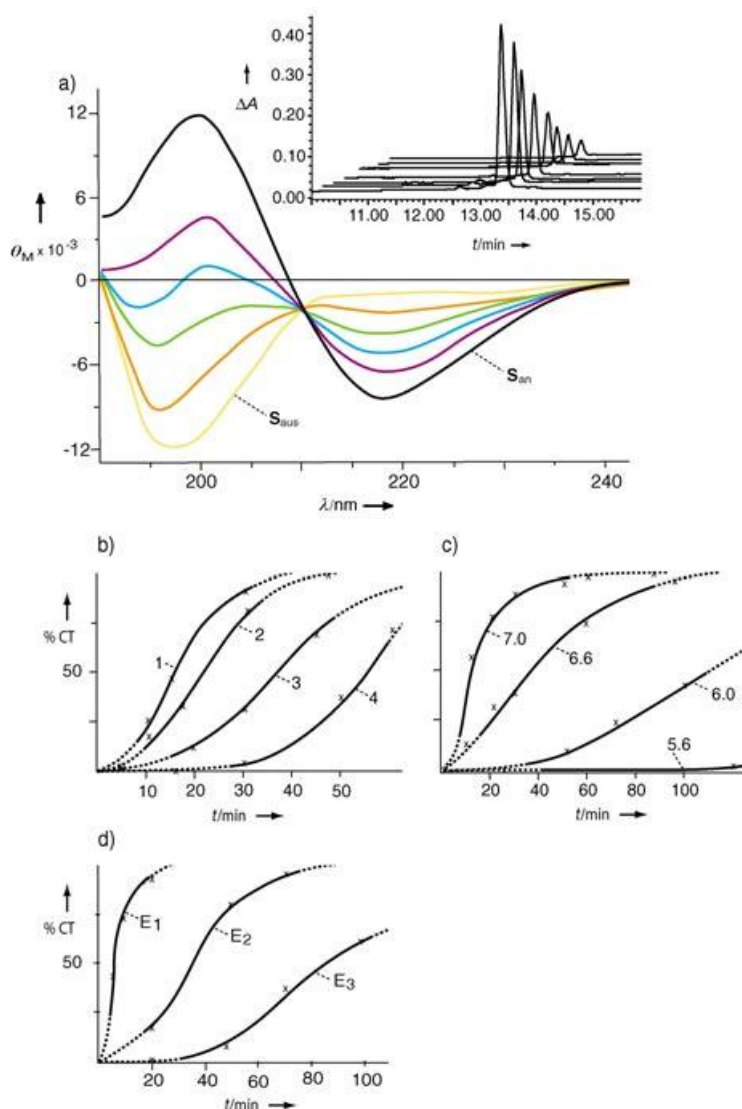


Abbildung 3. Bildung der β -Faltblattstruktur in statu nascendi von **Ila**: a) Verlauf des Konformationsübergangs von ungeordneter zu β -Faltblattstruktur bei pH 6.6 ($c = 7.2 \times 10^{-6}$ M), ausgelöst durch Acyltransfer (Einschub: HPLC). Abhängigkeit des CT von b) der Konzentration bei pH 6.6 (1: $c = 2.9 \times 10^{-5}$ M; 2: $c = 1.45 \times 10^{-5}$ M; 3: $c = 7.2 \times 10^{-6}$ M; 4: $c = 3.6 \times 10^{-6}$ M); c) dem pH-Wert (Konzentration von **Ila** im S_{aus} -Zustand $c = 8 \times 10^{-6}$ M); d) der enzymatischen Abspaltungsmethode von **Y** (**IId** (Trypsin, E1), **IIb** (Esterase, E2), **IIc** (Pyroglutamat-Aminopeptidase, E3)).

formationsübergang ausschließlich auf der Induktion durch Acylwanderung beruht. Durch HPLC (Bestimmung von $t_{1/2}$ der Acylwanderung) sowie CD-Spektroskopie oder alternative Methoden können quantitative Daten über Kinetik und experimentelle Parameter der Bildung von β -Faltblattstrukturen erhalten werden.

Da die Acylwanderung auf unterschiedliche Weise ausgelöst werden kann, lässt sich die Geschwindigkeit der Strukturbildung stark variieren (von $t_{1/2} < 1$ min bis zu mehreren Stunden). Für die β -Faltblattstrukturbildung von **IIa** beträgt $t_{1/2}$ bei pH 6.6 und gegebener Konzentration (7.2×10^{-6} M) 38 min (Kurve 3 in Abbildung 3b). Bei physiologischem pH-Wert hingegen findet der Konformationsübergang bereits nach ca. 10 min statt (siehe Abbildung 3c). Enzymatisch abspaltbare N-Schutzgruppen bieten eine vielseitige Alternative zur gezielten In-vitro-Auslösung von Konformationsübergängen, wie am Beispiel der Trypsin-, Esterase- und Pyroglutamat-Aminopeptidase-induzierten Acyltransfer-Reaktionen gezeigt werden konnte (E1–E3, Abbildung 3d). Alle hier untersuchten Enzyme spalten hoch spezifisch am N-Terminus (Arg-Ser, E1; Acetylerbindung in Acoecoc, E2; pGlu-Ser, E3) des Zielpeptids **P**.^[21]

Mithilfe von Wirt-Gast-Techniken^[4c] kann das lokale Umfeld von aus dem Protein herausgelösten Peptidsequenzen imitiert werden. So konnte mit Partialsequenzen aus dem Amyloid β (14–24) und der „Islet“-Protein-Partialsequenz NFGAIL^[1,6] (**IIIa, b**) ein Konformationsübergang von der ungeordneten zur β -Faltblattstruktur bei gleichzeitiger Bildung von Fibrillen induziert werden (Abbildung 4a). Diese Wirt-Gast-Switch-Peptide erlauben, den Einfluss und damit die biologische Effizienz von externen Faktoren – z. B. Inhibitoren und β -Faltblatt-zerstörenden Verbindungen (so genannten β -Brechern) – auf die kritische Konzentration für die β -Faltblattbildung zu bestimmen.^[2,6,22]

Für den Entwurf von Verbindungen, welche die Bildung von Amyloidfibrillen inhibieren oder Amyloidfibrillen zerstören können, ist das Konzept der „Entkopplung“ von Erkennung (σ inaktiv, S_{aus}) und Funktion (σ aktiv, S_{an}) des Moleküls von besonderer Bedeutung. Mit dieser Zielsetzung wurden Pseudoprolin (Ψ Pro)-Bausteine als β -Faltblatt-brechende Induktionseinheiten σ an das Erkennungspeptid **P** gekuppelt (Strategie C, Abbildung 1, Switch-Peptide **IVa–c**). Wegen der konformativen Entkopplung von σ und **P** im S_{aus} -Zustand sollte die Tendenz von **P** zur Bildung einer β -Faltblattstruktur die Anlagerung an ein Wirt- β -Faltblatt oder an Fibrillen begünstigen. So liegt das amphiphile Oligopeptid **P** in **IVa** mit $n < n_c$ bei pH 7 in einer ungeordneten Konformation vor. In Gegenwart eines Wirt-Oligopeptids mit $n > n_c$ als Templat wird dagegen im CD-Spektrum (Abbildung 4b) eine β -Faltblattstruktur von **IVa** beobachtet („Erkennungszustand“). Ähnlich können sich die vom Amyloid abgeleiteten Peptide **P** (**IVb, c**) als Erkennungssequenzen an natives Amyloid β anlagern. Durch gezielte Induktion der Acylwanderung wird die *cis*-Amidbindung von Ψ Pro zum Bestandteil der Peptidkette, und der strukturunterbrechende („ β -brechende“) Effekt von Ψ Pro^[6a,7b,23] wird induziert. Dies wird durch die Entstehung ungeordneter Strukturen der Peptide **IVa–c** auch in Gegenwart des Templats belegt (S_{an} , Abbildung 4b).

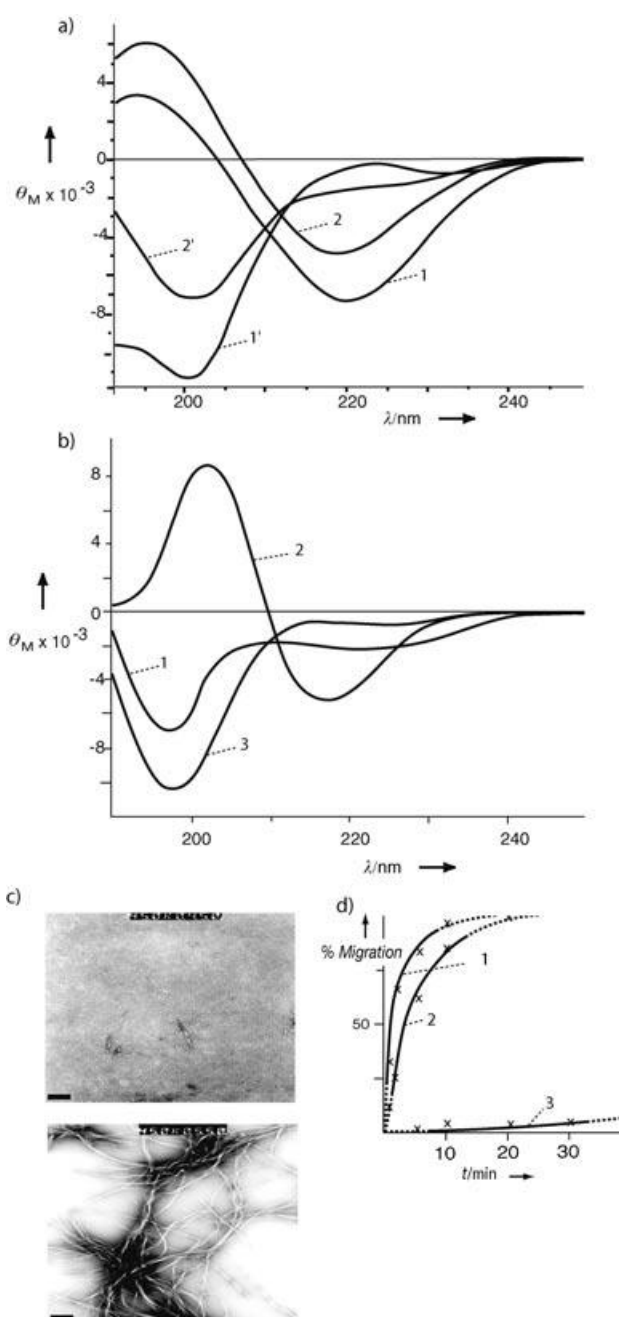


Abbildung 4. Wirt-Gast-Techniken zur Untersuchung von Konformationsübergängen. a) CD-Spektrum des ISN-induzierten Übergangs von einer ungeordneten (S_{aus} , pH 4) zu einer β -Faltblattstruktur (S_{an} , pH 7) der Peptide **IIIa** (1', 1) und **IIIb** (2', 2). b) CD-Spektrum von **IVa** in Abwesenheit (1) und Gegenwart (2) eines β -Faltblatt-Templats (1:1 Mischung von **IVa** (S_{aus}) und **IIa** (S_{an})) und (3) von **IIa** (S_{an}) in Gegenwart von **IVa** im S_{an} -Zustand. c) Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Peptids **IIa** im S_{aus} - (oben) und S_{an} - Zustand (unten) nach 2 Tagen. d) Kinetik des Acyltransfers der Peptide **IVa** (1), **IVc** (2), **IVb** (3).

Interessanterweise lagern sich Switch-Peptide, die einen Ψ Pro-Baustein enthalten, mit deutlich unterschiedlichen Halbwertszeiten (Abbildung 4d) um; das Cystein-haltige **IVc** neigt wesentlich stärker als das Serin-haltige **IVb** zu intramolekularer Acylwanderung. Erste In-vitro-Untersuchungen zur Unterbrechung von Amyloidfibrillen^[6a,24] durch

IVa–IVc lassen auf interessante therapeutische Anwendungen dieser Switch-Peptide schließen.^[25]

Zum Abschluss haben wir getestet, ob das Neuropeptid Y (NPY) durch einen ISN-induzierten Konformationsübergang in seine biologisch aktive Form überführt werden kann. Durch die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von NPY und seinen kürzeren Analoga^[26] konnte gezeigt werden, dass das C-terminale Peptid NPY(21–36) die minimale Kettenlänge für die spezifische Bindung an den NPY-Y2-Rezeptor aufweist. Als biologisch aktive Konformation dieser Sequenz wird eine Helixstruktur postuliert. Entkoppelt man die Peptidblöcke NPY(21–31) und NPY(33–36) durch Einfügen eines von Thr32 abgeleiteten Schaltelements **S**, liegt das resultierende Switch-Peptid in einer ungeordneten Struktur vor ($n < n_c, \alpha$) und zeigt praktisch keine Bindung an Y2 ($IC_{50} \gg 10 \text{ nM}$ ^[21]). Durch das Auslösen der O→N-Acylwanderung ($t_{1/2} = 20 \text{ min}$ bei pH 5.8, $t_{1/2} < 2 \text{ min}$ bei physiologischem pH-Wert) bildet sich das native, helicale Peptid NPY(21–36; typische CD-Spektren in Abbildung 5); gleichzeitig wird die Induktion der biologischen Funktion beobachtet ($IC_{50} = 0.8 \text{ nM}$).

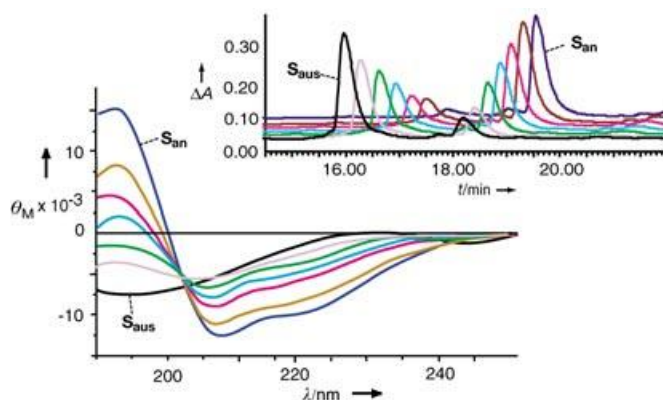
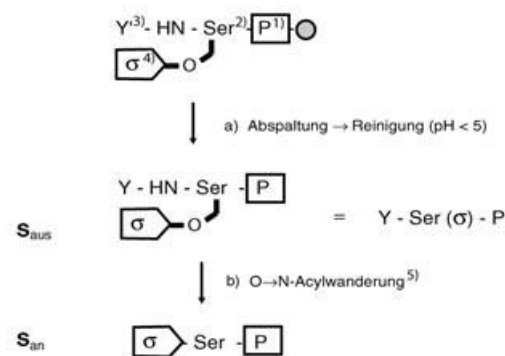


Abbildung 5. ISN-Induktion von Sekundärstruktur und Funktion. CD-Spektrum des Verlaufs der Helixbildung von **V**. Einschub: Zeitlicher Verlauf des Acyltransfers im HPLC.

Das an einem festen Träger synthetisierte, mit mehreren **S**-Elementen modifizierte Switch-Peptid Amyloid β (1–42)^[22a] wurde ebenfalls untersucht: Anders als das native Peptid liegt das Molekül in einer ungeordneten Struktur vor und zeichnet sich vor allem durch eine ausgesprochen gute Löslichkeit bei der Peptidsynthese und Reinigung aus.^[27]

Das Konzept der ISN-Induktion von Struktur und Funktion erlaubt erstmals die Untersuchung von Konformationsübergängen, die in nativen Peptiden und Proteinen beobachtet werden, unter biologisch relevanten Bedingungen. So können Konformationsänderungen, die zu Selbstassoziation, Polymerisation und irreversibler Aggregation als frühe Ereignisse bei degenerativen Erkrankungen führen, auf molekularer Ebene untersucht werden. Dies erlaubt ein besseres Verständnis von Proteinfaltung und molekularen Wechselwirkungen- und Erkennungsprozessen und eröffnet neue Perspektiven in der Biosensortechnologie sowie im Wirkstoffdesign.



- 1) Festphasen-Peptidsynthese [28]
- 2) Variante A: a) Y'-Ser-OH (Thr, Cys) b) Fmoc-Axx-OH
Variante B: Y'-Ser(Fmoc-Axx)-OH
- 3) Y'1 = Boc Y'2 = Acococ Y'3 = Boc-Arg(Boc)₂ Y'4 = pGlu
Y1 = H Y2 = Acococ Y3 = Arg Y4 = pGlu
- 4) a) - Fmoc
b) a1: SPPS (Schritt 1)
a2 (Ncap): Amidbildung (1a, Tabelle 1)
a3 (YPro): Ester-/Thioester-Bildung (IVb, c)
- 5) Y1: pH-Regulierung
Y2: Esterase
Y3: Trypsin
Y4: Pyroglutamat-Aminopeptidase

Schema 1. Synthese von Switch-Peptiden (siehe Abbildung 1 und Tabelle 1).

Experimentelles

Peptidsynthese: Die Switch-Peptide **I–V** werden nach Standardvorschriften für die Peptidsynthese an fester Phase nach der Fmoc-Strategie am Rink-4-Methylbenzhydrylamin(MBHA)-Harz aufgebaut (Schritt 1 in Schema 1). Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 20-proz. Piperidin in Dimethylformamid werden die Aminosäuren (2 Äquiv.) mit PyBOP oder DIC/HOBt in Gegenwart von DIPEA gekuppelt (bei nicht vollständigem Umsatz wird die Kupplung wiederholt). Die Peptide werden mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) vom Harz abgespalten, durch HPLC gereinigt und durch Aminosäurenanalyse und ESI-MS charakterisiert. PyBOP = Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat; DIC = Diisopropylcarbodiimid; HOBt = 1-Hydroxy-1H-benzotriazol; DIPEA = N,N-Diisopropylethylamin; TFA = Trifluoressigsäure; TIS = Triisopropylsilan.

Das N-terminale Serin des Zielpeptids **P** (Schaltelement **S**, Schritte 2–4 in Schema 1, Variante A) wird als Na-Boc-geschützter Baustein gekuppelt. Zur Veresterung der Serinseitenkette werden 3 Äquiv. von Na-Fmoc-geschützter Aminosäure mit DIC (3 Äquiv.) und DMAP (0.1 Äquiv.) in wasserfreiem Dichlormethan umgesetzt. Alternativ wird das Schaltelement **S** als N(Y')-geschütztes O-Acylisodipeptid [16a, 21] während der Festphasensynthese eingebaut (Variante B, Schema 1). DMAP = Dimethylaminopyridin.

Induktion der O→N-Acylwanderung (Schritt 5 in Schema 1): pH-Induktion (**Y1**): Vorratslösungen der Switch-Peptide werden hergestellt (10^{-3} M in doppelt destilliertem Wasser, pH < 5), ein Aliquot entnommen und der pH-Wert durch Zugabe von Natriumphosphatpuffer (100 mmol) eingestellt. Zur Verfolgung der O→N-Acylwanderung mittels HPLC werden in regelmäßigen Zeitabständen 20- μL -Aliquote entnommen, die Reaktion durch Zugabe von 0.2N HCl gestoppt und die Proben anschließend analysiert.

Enzymatische Induktion (Y2–4): 1 mg des Peptids wird in 500 μL Natriumphosphatpuffer (pH 7) bei 37°C gelöst und mit dem entsprechenden Enzym versetzt (0.1 mg Trypsin (**Y3**); 50 μL Pyroglutamat-Aminopeptidase (**Y4**); einige Kügelchen immobilisierter Esterase (**Y2**)). Der Reaktionsverlauf wird wie oben beschrieben mittels HPLC verfolgt.

CD-Spektren wurden mit einem Jasco-J-810-Spektralanalysator, ausgestattet mit einem Jasco-Peltier-Temperaturkontrollgerät, in Quarzküvetten bei einer Konzentration von $c = 10^{-5}$ M (Hellma, QS, Schichtdicke 0.1 cm) aufgenommen.

ESI-Massenspektren wurden an einem Finnigan-MAT-SSQ-710C-Spektrometer (Software Technivent Vector II) im positiven Ionisierungsmodus durchgeführt.

Eingegangen am 17. Februar 2004 [Z54045]

Stichwörter: Alzheimer-Krankheit · Circular dichroismus · Proteinfaltung · Proteinstrukturen · Switch-Peptide

- [1] *Self-Assembling Peptide Systems in Biology, Medicine and Engineering* (Hrsg.: A. Aggeli, N. Boden, S. Zhang), Kluwer, Dordrecht, **2001**, zit. Lit.
- [2] a) B. Sommer, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2*, 87–92; b) C. Soto, *Mol. Med. Today* **1999**, *5*, 343–350; c) L. C. Serpell, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1502*, 16–30; d) P. Hammerström, R. L. Wiseman, E. T. Powers, J. W. Kelly, *Science* **2003**, *299*, 713–716; e) J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353–356.
- [3] a) J. P. Taylor, J. Hardy, K. H. Fischbeck, *Science* **2002**, *296*, 1991–1995; b) C. Soto, *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 49–60; c) S. W. Liebman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9098–9100.
- [4] a) T. E. Creighton, *Proteins*, 2. Aufl., Freeman, New York, **1993**; b) C. L. Nesloney, J. W. Kelly, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 739–766; c) M. J. I. Andrews, A. B. Tabor, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11711–11734; d) C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, *Biopolymers* **2001**, *60*, 396–419; e) M. Mutter, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 639–653; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 639–653.
- [5] a) S. Vuilleumier, M. Mutter, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 551–692; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535–554; b) J. P. Schneider, J. W. Kelly, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2169–2187; c) M. S. Searle, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, *2*, 1011–1020; d) M. P. Glenn, D. P. Fairlie, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 433–445; e) X. Li, J. Chmielewski, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 901–904.
- [6] a) C. Adessi, M.-J. Frossard, C. Boissard, S. Fraga, S. Bieler, T. Rueckle, F. Vilbois, S. M. Robinson, M. Mutter, W. A. Banks, C. Soto, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13905–13911; b) K. Tenidis, M. Waldner, J. Berhagen, W. Fischle, M. Bergmann, M. Weber, M.-L. Merkle, W. Voelter, H. Brunner, A. Kapurniotu, *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 1055–1071.
- [7] a) C. Toniolo, M. Bonora, M. Mutter, V. N. R. Pillai, *Makromol. Chem.* **1981**, *182*, 1997–2005; b) M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145–153.
- [8] a) M. Mutter, R. Hersperger, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 195–197; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 185–187; b) M. Mutter, R. Gassmann, U. Buttke, K.-H. Altmann, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1504–1506; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1514–1516; c) H. Mihara, Y. Takahashi, I. Obataya, S. Sakamoto, in *Self-Assembling Peptide Systems in Biology, Medicine and Engineering* (Hrsg.: A. Aggeli, N. Boden, S. Zhang), Kluwer, Dordrecht, **2001**, S. 187–205; d) R. S. Signarvic, W. F. DeGrado, *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 1–12; e) O. Hémin, B. Barbier, F. Boillot, A. Brack, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 218–226.
- [9] D. M. Coltart, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3449–3491.
- [10] a) D. S. Kemp, D. J. Kerkman, S.-L. Leung, G. Hanson, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 490–498; b) M. Brenner, W. Hofer, *Helv. Chim. Acta* **1961**, *44*, 1794–1801.
- [11] a) Y. Shao, H. Paulus, *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 193–198; b) I. Giriat, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7180–7181; c) H. D. Mootz, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9044–9045.
- [12] a) T. Johnson, M. Quibell, R. C. Sheppard, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 11–25; b) L. P. Miranda, W. D. F. Meutermans, M. L. Smythe, P. F. Alewood, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5460–5468; c) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.* **2004**, 124–125; d) J. Offer, C. N. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642–4646.
- [13] a) R. Oliyai, V. J. Stella, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2735–2740; b) T. R. Hurley, C. E. Colson, G. Hicks, M. J. Ryan, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1496–1498; c) Y. Hamada, H. Matsumoto, S. Yamaguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 159–170; Y. Hamada, H. Matsumoto, S. Yamaguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 4155–4167; d) W. M. Kazmierski, P. Bevans, E. Furfine, A. Spaltenstein, H. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2523–2526.
- [14] a) J. P. Tam, J. Xu, K. D. Eom, *Biopolymers* **2001**, *60*, 194–205; b) P. E. Dawson, B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960; c) S. Kent, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 574–593; d) K. D. Eom, Z. Miao, J.-L. Yang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 73–82.
- [15] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [16] a) *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)*, Vol. E 22d, **2003**, S. 7–67; b) O. Kuisle, E. Quiñoa, R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8063–8075; c) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268–5269; d) *Synthetic Peptides* (Hrsg.: G. A. Grant), 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **2002**.
- [17] a) P. J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Hanser, New York, **1988**; b) I. L. Karle, C. Das, P. Balaram, *Biopolymers* **2001**, *59*, 276–289.
- [18] a) D. Kadereit, H. Waldmann, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3367–3396; b) A. R. Hamel, F. Hubler, A. Carrupt, R. Wenger, M. Mutter, *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 1–8; c) H. Bundgaard, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1989**, *3*, 39–65; d) X. Sung, C. R. Xu, H. T. He, T. J. Siahhaan, *Bioorg. Chem.* **2002**, *31*, 285–301; e) J. Mozdzanowski, J. Bongers, K. Anumula, *Anal. Biochem.* **1998**, *260*, 183–187; f) C. J. Bosques, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7530–7531.
- [19] a) J. S. Nowick, J. O. Brower, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 876–877; b) R. Aurora, G. D. Rose, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 21–38; c) W. Maison, E. Arce, P. Renold, R. J. Kennedy, D. S. Kemp, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10245–10254; d) D. Obrecht, M. Altorfer, J. A. Robinson, *Adv. Med. Chem.* **1999**, *4*, 1–68; e) K. Müller, D. Obrecht, A. Knierzinger, C. Stankovic, C. Spiegler, W. Bannwarth, A. Trzeciak, G. Englert, A. M. Labhard, P. Schönholzer, in *Perspectives in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger), Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, **1993**, S. 513–533; f) F. Formaggio, A. Bettio, V. Moretto, M. Crisma, C. Toniolo, Q. B. Broxterman, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 461–466.
- [20] a) K.-H. Altman, A. Flörsheimer, M. Mutter, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 314–319; b) C. Toniolo, G. M. Bonora, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 450–454.
- [21] S. Dos Santos, K. Murat, E. Grouzmann, M. Mutter, in Vorbereitung.
- [22] a) P. M. Gorman, A. Chakrabarty, *Biopolymers* **2001**, *60*, 381–394; b) C. Hetényi, T. Körtvélyesi, B. Penke, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1587–1593.
- [23] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218–9227.
- [24] a) B. Permann, C. Adessi, G. P. Saborio, S. Fraga, M.-J. Frossard, I. Dewachter, J. Van Dorpe, W. A. Banks, F. Van Leuven, C. Soto, *FASEB J.* **2002**, *16*, 860–862; b) T. Oishi, K. Hagiwara, T. Kinumi, Y. Yamakawa, M. Nishijima, K. Nakamura, H. Arimoto, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2626–2629; c) S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin, M. R. Hurle, *Biochemistry* **1995**, *34*, 724–730; d) Y. Kuroda, Y. Maeda, H. Hanaoka, K. Miyamoto, T.

- Nakagawa, *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 8–17; e) L. O. Tjernberg, D. J. E. Callaway, A. Tjernberg, S. Hahne, C. Lilliehöök, L. Terenius, J. Thyberg, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12619–12625; f) D. J. Gordon, K. L. Sciarretta, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237–8245; g) M. Lopez de la Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C. M. Dobson, A. Hoenger, L. Serrano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16052–16057.
- [25] M. Mutter, J. Dubochet, M. Adrian, E. Grouzmann, C. Soto, in Vorbereitung.
- [26] a) A. Beck-Sickinger, G. Jung, *Biopolymers* **1995**, *37*, 123–142; b) D.-D. Malis, E. Grouzmann, D. R. Morel, M. Mutter, J.-S. Lacroix, *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1–8.
- [27] C. Arunan, M. Mutter, in Vorbereitung.
- [28] a) J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical, Rockford, IL, **1984**; b) G. A. Grant, *Synthetic Peptides*, 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **2002**; c) H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787.