

Glycomimetische Cyclopeptide stimulieren Neuritenwachstum**

Dirk Bächle, Gabriele Loers, Eckhart W. Guthöhrlein,
Melitta Schachner und Norbert Sewald*

Kohlenhydrate spielen eine wesentliche Rolle in einem breiten Spektrum physiologischer oder pathologischer Prozesse, von denen viele auf molekularer Erkennung beruhen.^[1] Oligosaccharide, die auf der Oberfläche etwa einer Tumorzelle oder eines Pathogens präsentiert werden, sind potentielle Zielstrukturen für direkte Therapie oder Impfung.^[2] Die Synthese Kohlenhydrat-basierter Wirk- oder Impfstoffe erfordert trotz aller methodischen Fortschritte im Bereich der Oligosaccharidsynthese^[3,4] anspruchsvolle mehrstufige Reaktionssequenzen. Darüber hinaus haben Oligosaccharide meist ungünstige ADME-Parameter (ADME = Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion).^[5]

Peptide, die in der Lage sind, Oligosaccharide in ihrer Funktion und Struktur nachzuahmen, könnten auf einfache und elegante Weise eingesetzt werden, um in die Wechselwirkung zwischen komplexen Kohlenhydraten und ihren Rezeptoren einzutreten.^[6] Dabei sind Cyclopeptide wegen ihrer höheren metabolischen Stabilität privilegiert.

Phagendisplay-Techniken eignen sich zum Auffinden glycomimetischer Peptidepitope, die entweder direkt an Oligosaccharid-Rezeptoren oder an monoklonale Antikörper mit Spezifität gegen ein Oligosaccharid-Antigen binden. Wir wählten das Glycan HNK-1^[7,8] der humanen natürlichen Killerzelle als Zielstruktur unserer Untersuchungen (Abbildung 1). Sein Konsensus-Epitop wird auf Glycolipiden und Glycoproteinen gefunden und besteht aus einer 3'-sulfatierten Glucuronsäure, gebunden an N-Acetyllactosamin. HNK-1 und seine Bindungspartner sind in viele entwicklungsbiologische Prozesse des Nervensystems involviert.^[9] So wird das Neuritenwachstum von Motoneuronen in Gegenwart eines

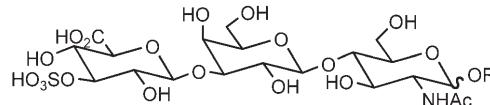


Abbildung 1. Das Trisaccharid-Konsensus-Epitop von HNK-1.

HNK-1 präsentierenden Substrates verstärkt, während das Neuritenwachstum von sensorischen Neuronen unbeeinflusst bleibt.^[8] HNK-1 wird entlang der Routen gefunden, denen Motoraxone folgen, wenn sie nach einer Verletzung peripherer Nerven wachsen.^[10] Daher haben HNK-1 und seine Mimetika das Potenzial, die Motoneuronen-spezifische Reinnervation zu unterstützen. Die Isolierung von HNK-1 aus natürlichen Quellen ist allerdings schwierig, und auch die chemische Synthese gestaltet sich anspruchsvoll, was die Identifizierung und strukturelle Optimierung von Glycomimetika, z. B. in Form von Peptiden, zu einer interessanten Alternative für mögliche klinische Anwendungen macht.

Ein Satz aus 26 cyclischen Hexapeptiden (Abbildung 2 und Hintergrundinformationen) wurde synthetisiert auf der Basis der linearen Peptidsequenzen TFKLSETTLEYY und TFQLSTRTLPS, gefunden im randomisierten Phagendisplay gegen den monoklonalen Antikörper 412.^[11] Die beiden Ausgangssequenzen wurden in sechs überlappende Hexapeptide unterteilt. Jede dieser Sequenzen wurde als Basis für die Synthese von Cyclohexapeptid-Subbibliotheken verwendet, wobei gleichzeitig ein D-Aminosäure-Scan durchgeführt wurde. In jedem Cyclopeptid wurde dazu jeweils eine L-Aminosäure durch ihr D-Enantiomer ersetzt und ein Diastereomer erzeugt.^[12] Während sich die Konformationen eines cyclischen Hexapeptids normalerweise rasch ineinander umwandeln, bewirkt das Vorhandensein eines Bausteins mit

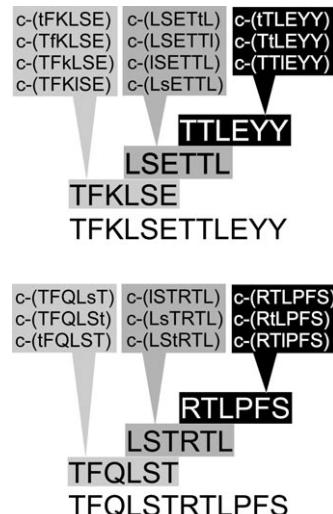


Abbildung 2. Cyclopeptid-Scan und D-Aminosäure-Scan führen zu Serien linearer und cyclischer Hexapeptide, die von den Peptidsequenzen TFKLSETTLEYY und TFQLSTRTLPS abgeleitet sind. Cyclohexapeptide werden als paarweise pseudo-symmetrisch hinsichtlich der Geometrie der beiden komplementären β-Schleifen betrachtet. Daher wurden in vielen Fällen nur drei der sechs möglichen Peptide untersucht.

[*] Dr. D. Bächle, Dr. E. W. Guthöhrlein, Prof. Dr. N. Sewald
Fakultät für Chemie, Organische und Bioorganische Chemie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-8094
E-Mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de
Homepage: www.uni-bielefeld.de/chemie/oc3neu
Dr. G. Loers, Prof. Dr. M. Schachner
Zentrum für Molekulare Neurobiologie
Universität Hamburg
Martinistraße 52, 20246 Hamburg (Deutschland)

[**] Wir danken der Erika und Conrad W. Schnyder-Stiftung, der NRW Graduate School in Bioinformatics and Genome Research, Universität Bielefeld (Doktorandenstipendium an E.W.G.), der DFG (SFB 613) und dem FCI für die Förderung des Projektes.

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

Sekundärstruktur-induzierenden Eigenschaften (z.B. Prolin, D-Aminosäuren) die Stabilisierung einer bevorzugten globalen Konformation. D-Aminosäuren werden bevorzugt in Position $i + 1$ einer $\beta\text{II}'$ -Schleife gefunden. Daher präsentiert das Peptid die funktionellen Gruppen möglicher Elemente der molekularen Erkennung in einer vorhersagbaren dreidimensionalen Anordnung, die durch die relative Position der D-Aminosäure weitgehend festgelegt wird (spatial Screening^[13]). Ein Cyclopeptid hat geringere konformative Flexibilität und daher weniger Freiheitsgrade als die lineare Vorstufe. Wenn dem Cyclopeptid noch die Bindung an einen Rezeptor möglich ist, profitiert das Bindungsergebnis dementsprechend von einem geringeren Entropieverlust als bei der Bindung eines linearen Peptids.

Mit Oberflächenplasmonenresonanz wurde die Bindung der Peptide an den immobilisierten Antikörper 412 charakterisiert. Bemerkenswerte Effekte wurden für die TFKL-SETTLEYY-Serie registriert (Abbildung 3). In dem mittle-

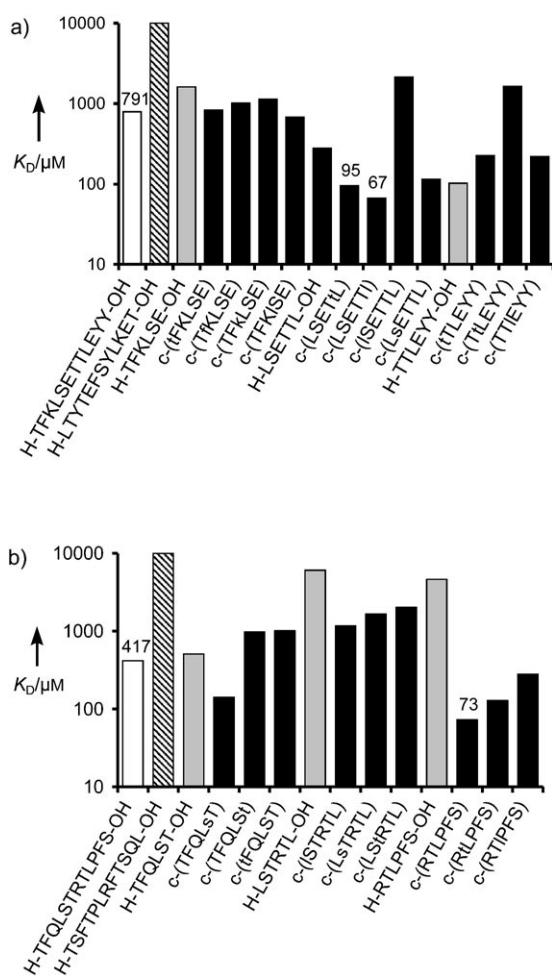


Abbildung 3. K_D -Werte der von der jeweiligen Basissequenz abgeleiteten Peptide für die Bindung an den Antikörper 412, bestimmt durch Oberflächenplasmonenresonanz. Weiße Säulen: Basissequenz; schraffierte Säulen: randomisierte Sequenz; graue Säulen: lineare Hexapeptide; schwarze Säulen: Cyclohexapeptide. Die K_D -Werte sind in ausgewählten Fällen explizit angegeben. Für Säulen, die den maximal angezeigten Wert erreichen (10000 μM), wurde keine Bindung beobachtet. Fehlerbalken sind wegen der logarithmischen Skala nicht sichtbar.
 a) TFKLSETTLEYY; b) TFOLSTRTPFPS.

ren Epitop LSE TTL wurde eine deutliche sequenz- und konformationsabhängige Affinität beobachtet (Abbildung 3a). Das d-Leu enthaltende Cyclopeptid c-(LSE TTL) wurde vom Antikörper mit $K_D = 67 \mu\text{M}$ gebunden, was einer zwölffachen Steigerung gegenüber dem K_D -Wert für das lineare Dodecapeptid sowie einer vierfachen Steigerung gegenüber demjenigen für das lineare LSE TTL entspricht.

Ein Alanin-Scan zeigte die Bedeutung der Teilesequenz ETTI. Das Peptid c-(ISETTL), in dem die D-Aminosäure relativ zu c-(LSEETTl) um eine Position verschoben ist, stellt den Mismatch-Fall mit offenbar unpassender Ausrichtung der Seitenketten und entropisch ungünstiger Wechselwirkung dar. Interessanterweise zeigten die beiden Cyclohexapeptide c-(LSETtL) und c-(LsETTL), die als pseudo-symmetrisch hinsichtlich der Geometrie der beiden komplementären β -Schleifen gelten können, ähnliche Affinitäten zum Antikörper (Abbildung 3a). In der TFQLSTRTPFS-Serie wurde mit c-(RTLPFS) ($K_D = 73 \mu\text{M}$) ein weiteres affines Peptid gefunden (Abbildung 3b). Dieses Peptid benötigt keine D-Aminosäure zur Stabilisierung der Schleifenstrukturen, da Prolin ebenfalls in der Lage ist, diese zu induzieren. Die cyclischen Derivate des C-terminalen Hexapeptids RTLPFS wiesen alle beträchtlich höhere Affinität zum Antikörper auf als ihre linearen Hexapeptide (64fach) und linearen Dodecapeptide (6fach).

Ausgewählte Peptide wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Neuritenwachstum bei murinen und humanen Motoneuronen zu stimulieren (Abbildung 4a). Dazu wurden Motoneuron-Präparationen aus Embryonen auf Deckgläsern kultiviert, die nur mit Poly-L-ornithin (PLO) als Negativkontrolle oder mit PLO und den HNK-1-Mimetika beschichtet waren. Laminin stimuliert bekanntlich das Wachstum von Neuriten^[14,15] und wurde daher als Positivkontrolle verwendet. Das Neuritenwachstum sowohl der murinen als auch der humanen Motoneuronen (Abbildung 4a) wurde durch die glycomimetischen Cyclopeptide c-(LSETTL) und c-(RTLPFS) stimuliert. Beide Cyclohexapeptide hatten auch einen deutlich positiven Effekt auf die Überlebensrate von Motoneuronen (Steigerung um ca. 30% nach acht Tagen *in vitro* im Vergleich zu PLO, Abbildung 4b). Beide Effekte, die Stimulierung des Neuritenwachstums und die Erhöhung der Überlebensrate, waren nicht nur stärker als bei den linearen Dodecapeptiden, sondern hingen auch signifikant von der Konformation ab. Das Peptid c-(ISETTL), dessen Schleifengeometrie sich wegen der veränderten Position der D-Aminosäure grundsätzlich von denjenigen von c-(LSETTL) unterscheiden sollte, zeigte keinerlei signifikante funktionelle Aktivität. Bei Vorinkubation des Antikörpers 412 mit dem HNK-1 präsentierenden murinen Glycoprotein L1 ging die Bindung von c-(LSETTL) und c-(RTLPFS) deutlich zurück. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Peptide funktionelle Mimetika des Oligosaccharids HNK-1 sind.

Die Lösungskonformationen von c-(LSETTI) und c-(RTLPFS) wurden mittels NMR-Spektroskopie in Kombination mit Moleküldynamiksimulationen untersucht. Das Peptid c-(LSETTI) populiert einen einzelnen Konformerencluster, der durch eine β II'-Schleife mit d-Leu in Position $i + 1$ und eine komplementäre β I-artige Schleife um -Ser-Glu-Thr-Thr- charakterisiert ist (Abbildung 5). Das Vorliegen einer

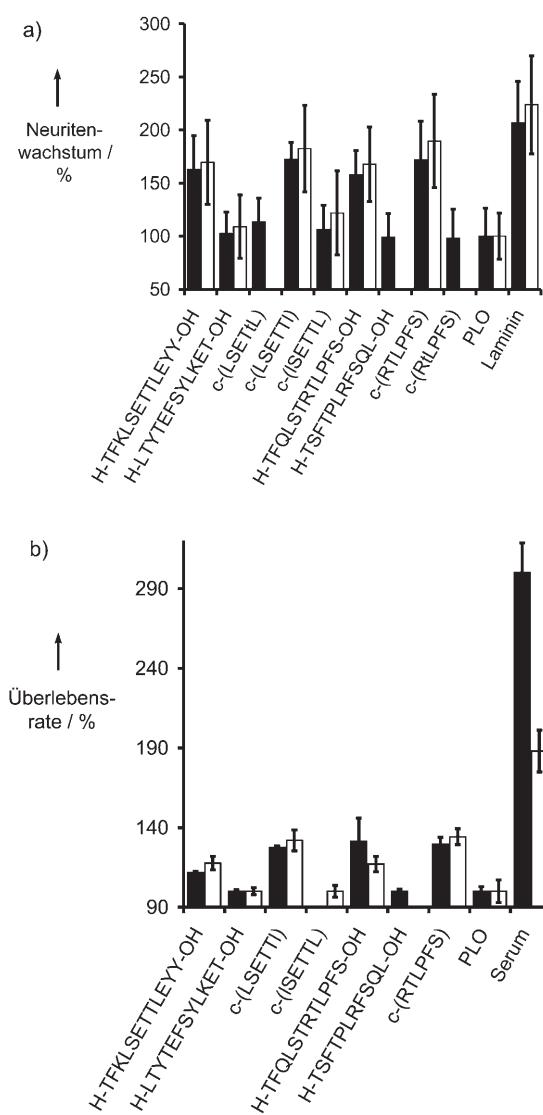


Abbildung 4. Neuritenwachstum (Abbildung 4 a; Mittelwerte \pm Standardabweichungen) und Überlebensraten (Abbildung 4 b, Mittelwerte \pm Standardabweichungen) muriner (schwarze Säulen) und humaner (weiße Säulen) Motoneuronen auf Poly-L-Ornithin (PLO) in Gegenwart glycomimetischer Peptide, Laminin oder nach Zugabe von Serum. Das Neuritenwachstum und die Überlebensrate sind relativ zur Negativkontrolle PLO (= 100%) angegeben. Die Experimente wurden dreifach für die Neuritogenese und zweifach für die neuronale Überlebensrate durchgeführt.

β II'-Schleife wird gestützt durch starke Kern-Overhauser-Effekte (NOEs) zwischen H^a (D-Leu) und H^N (Leu) sowie zwischen H^N (Leu) und H^N (Ser), während starke NOEs zwischen H^N (Glu) und H^N (Thr⁴) sowie zwischen H^N (Thr⁴) und H^N (Thr⁵) die Klassifizierung der komplementären Schleife als β I-artig bestätigen.

Das Peptid c-(RTLPFS) liegt als 2:1-Konformerenmischung mit *trans*- bzw. *cis*-Konfiguration der Leu-Pro-Peptidbindung vor. Das Hauptkonformer enthält ausschließlich *trans*-Peptidbindungen und nimmt eine γ -Schleife mit Arg in Position *i* + 1 ein, die durch eine Wasserstoffbrücke zwischen H^N (Thr) und CO(Ser) stabilisiert wird. Diese γ -Schleife

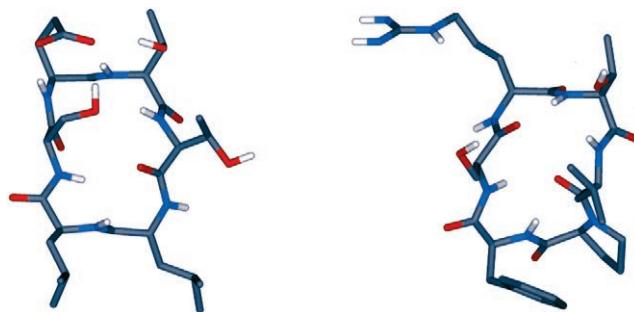


Abbildung 5. Links: Lösungskonformation von c-(LSETTI) in $[D_6]DMSO$. Rechts: Lösungskonformation von c-(RTLPFS) in $[D_6]DMSO$, Hauptkonformer. Blau N, rot O, weiß H, grau C.

wurde während der Trajektorie von einer β -Schleife mit Arg in *i* + 1-Position überlagert. Gestützt wird dies durch ein starkes NOE-Kreuzsignal zwischen H^N (Thr) und H^N (Leu). Prolin nimmt Position *i* + 1 einer γ -Schleife ein, die ebenfalls von einer β -Schleifen-artigen Konformation überlagert wird, jedoch nicht als eine der idealen Schleifenstrukturen klassifiziert werden kann (Abbildung 5). Das Nebenkonformer enthält eine *cis*-Peptidbindung um Leu-Pro und ist wesentlich flexibler als das all-*trans*-konfigurierte Pendant.

Beide Peptide enthalten, wie für Kohlenhydratmimetika zu erwarten, Aminosäuren mit Hydroxygruppen in den Seitenketten (Ser, Thr). Zusätzlich können die Rückgrat-Amidbindungen der Peptide als intermolekulare Wasserstoffbrückendonoren und -acceptoren fungieren. Unpolare Aminosäuren sind in beiden Peptiden enthalten und können hydrophobe Wechselwirkungen mit den Rezeptoren eingehen. c-(LSETTI) benötigt für Affinität zum Antikörper 412 den Glutamatrest (E), der möglicherweise einen negativ geladenen Substituenten des HNK-1-Epitops nachahmt. Interessanterweise enthält c-(RTLPFS) keine saure Seitenkette, sondern einen basischen Argininrest.

Substanzen, die in der Lage sind, die Regenerierung von Neuriten nach Verletzungen zu unterstützen, könnten ein vielversprechender Ansatz zur Therapie querschnittsgelähmter Patienten sein. Die erfolgreiche Transformation der linearen Peptidsequenzen TFKLSETTLEYY und TFQLSTRTLPLFS als Mimetika des HNK-1-Trisaccharids in glycomimetische Cyclohexapeptide nach der Methode des spatial Screening zeigt klar, dass es möglich ist, die biologische Aktivität solcher Glycomimetika durch Rückgrat-Cyclisierung zu erhöhen.

Eingegangen am 21. April 2006
Online veröffentlicht am 8. September 2006

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Glycomimetika · Neuroaktive Substanzen · Neurochemie · Peptide

- [1] G. Reuter, H.-J. Gabius, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 368–422.
- [2] G. B. Lesinski, S. L. Smithson, N. Srivastava, D. Chen, G. Widera, M. A. J. Westerink, *Vaccine* **2001**, *19*, 1717–1726.
- [3] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495–4537.
- [4] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465–4493.

- [5] P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446–2471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300–2324.
- [6] M. A. Johnson, B. M. Pinto, *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 13–25.
- [7] M. Simon-Haldi, N. Mantei, J. Franke, H. Voshol, M. Schachner, *J. Neurochem.* **2002**, *83*, 1380–1388.
- [8] R. Kleene, M. Schachner, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 195–208.
- [9] D. K. Chou, S. Tobet, F. B. Jungalwala, *J. Neurosci. Res.* **2000**, *59*, 188–201.
- [10] R. Martini, M. Schachner, T. M. Brushart, *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7180–7191.
- [11] A. B. Noronha, A. Ilyas, H. Antonicek, M. Schachner, R. H. Quarles, *Brain Res.* **1986**, *385*, 237–244.
- [12] Für die Abkürzung der Aminosäuren wird der Ein-Buchstaben-Code verwendet; D-Aminosäuren werden durch den entsprechenden Kleinbuchstaben symbolisiert.
- [13] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374–1389.
- [14] D. Edgar, R. Timpl, H. Thoenen, *EMBO J.* **1984**, *3*, 1463–1468.
- [15] G. C. Sephel, K. I. Tashiro, M. Sasaki, D. Greatorex, G. R. Martin, Y. Yamada, H. K. Kleinman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 821–829.