

# Terminierung des Amyloid-Reißverschlusses durch Design

Aphrodite Kapurniotu\*

Amyloide  $\beta$ -Peptide · Computerchemie · Inhibitoren · Proteine · Sterischer Reißverschluss

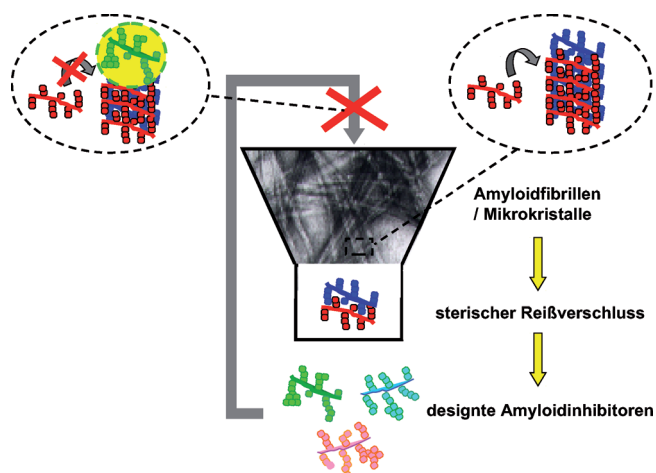
Die In-vivo-Proteinaggregation zu zytotoxischen Oligomeren und Amyloidfibrillen hängt mit Zellschädigung und der Pathogenese einer Zahl verheerender zelldegenerativer Krankheiten zusammen. Zu diesen zählen die Alzheimersche und Parkinsonsche Krankheit sowie die Typ-II-Diabetes.<sup>[1,2]</sup> Obwohl spezifische krankheitsassoziierte Proteine oder Polypeptide als Schlüsselkomponenten der Amyloidablagerungen bei jeder der Krankheiten gelten, liegen den amyloiden und zytotoxischen Selbstassoziationsprozessen der verschiedenen Proteine doch gemeinsame Mechanismen zugrunde, wie zunehmend evident wird.<sup>[1,2]</sup> Daher ist es inzwischen ein sehr wichtiges Ziel in der biomedizinischen Forschung, Moleküle zu entwickeln, die diese Prozesse blockieren könnten. Dies sollte sowohl zum Verständnis der molekularen Mechanismen, die Proteinaggregation mit Krankheit verknüpfen, beitragen als auch die Entwicklung von Strategien zur Therapie solcher bisher unheilbaren Krankheiten fördern. In den letzten beiden Jahrzehnten wurden verschiedene Stoffe entwickelt, die die Selbstassoziation und/oder die Zelltoxizität der Amyloidpolypeptide modulieren oder hemmen können. Hierzu zählen niedermolekulare organische Verbindungen, Antikörper sowie designte Peptide.<sup>[3,4]</sup> Allerdings findet bisher keines dieser Moleküle therapeutische Anwendung.

Einer der ersten chemischen Ansätze zum Design peptidbasierter Inhibitoren der Amyloidbildung und -toxizität machte sich das hohe Selbstassoziationspotenzial von spezifischen, kurzen,  $\beta$ -Faltblatt und Amyloid bildenden Segmenten der Amyloidpeptide zunutze.<sup>[3]</sup> So wurde gezeigt, dass nichtamyloidogene Peptidanaloga von so genannten „Amyloidkernsequenzen“ der amyloidbildenden Polypeptide die Amyloidbildung und Zelltoxizität inhibieren können.<sup>[3]</sup> Bei solchen Peptidanaloga handelt es sich oft um kurze Peptidsequenzen, die „ $\beta$ -Faltblatt brechende“, nichtnatürliche oder *N*-Methylaminosäuren enthalten.<sup>[3]</sup> Allgemein anwendbare computergestützte Ansätze zum Design von Inhibitoren der Amyloidbildung sind bisher allerdings noch nicht verfügbar. Mögliche Gründe hierfür könnten die unzureichende Information auf atomarer Ebene über die Fibrillenstruktur und die

zytotoxischen Aggregate sowie in einigen Fällen die konformative Flexibilität der amyloiden Polypeptide sein. Solche allgemein anwendbaren Ansätze würden es ermöglichen, eine große Zahl potenzieller Amyloidinhibitoren zu identifizieren und würden daher die Entwicklung von Therapeutika beschleunigen.

In ihrer aktuellen Studie<sup>[5]</sup> stellen nun Eisenberg, Baker et al. einen neuen, strukturbasierten und computergestützten Ansatz zum Design von peptidbasierten Inhibitoren der Amyloidbildung vor, der vermutlich allgemein anwendbar und offensichtlich hoch effektiv ist (Abbildung 1). Die Peptide, die nach diesem Ansatz entworfen wurden, zielen auf das Fibrillen-Ende und sollten somit die weitere Verlängerung der Fibrillen blockieren. Zum Design wurde die Rosetta-Software verwendet, und das Motiv des „sterischen Reißverschlusses“ lag als Strukturtemplat zugrunde.<sup>[6–8]</sup> Beim sterischen Reißverschluss handelt es sich um eine Struktur von einem Paar dicht gepackter  $\beta$ -Faltblätter mit komplementären und verzahnten Seitenketten, die die beiden Faltblätter zusammenhalten.<sup>[7,8]</sup> In vorangehenden Studien hatte die Gruppe um Eisenberg die fibrillenartigen atomaren Strukturen einer Reihe von sterischen Reißverschlüssen in Mikrokristallen charakterisiert. Die Mikrokristalle bestanden aus kurzen, Fibrillen bildenden und identischen Segmenten eines amyloiden Proteins; solche Mikrokristalle ließen sich aus verschiedenen amyloiden Proteinen herstellen.<sup>[7,8]</sup> Eisenberg et al. schlugen vor, dass solche Reißverschlussmotive das Rückgrat der Amyloidfibrille bilden und somit ihre grundlegende Struktureinheit sind.<sup>[7,8]</sup> Das in der aktuellen Studie angewendete Amyloidinhibitor-Designprinzip bestand darin, dass eine dichte Kontaktfläche zwischen dem sterischen Reißverschluss am Ende der Fibrille und dem inhibitorischen Peptid entworfen wurde, wodurch eine weitere Fibrillenverlängerung blockiert werden sollte. Hierzu können natürliche wie auch nichtnatürliche Aminosäuren eingesetzt werden. Das inhibitorische Peptid sollte sich an das Ende des Reißverschlussmotivs der Amyloidfibrille als  $\beta$ -Faltblattstrang anhängen können; dabei sollten alle Rückgrat-Wasserstoffbrücken des Inhibitorpeptids mit den  $\beta$ -Faltblattsträngen des Amyloid-Reißverschlusses gebildet werden (Abbildung 1). Zusätzlich sollte das Inhibitorpeptid Seitenketten aufweisen, die mit den Seitenketten der  $\beta$ -Faltblattstränge des Reißverschlussmotivs über die Fläche des  $\beta$ -Faltblattes eine maximale Zahl an Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen eingehen können. Aufgrund

[\*] Prof. Dr. A. Kapurniotu  
Fachgebiet Peptidbiochemie, Technische Universität München  
Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising (Deutschland)  
E-Mail: akapurniotu@wzw.tum.de  
Homepage: <http://www.wzw.tum.de/pbch>



**Abbildung 1.** Design der peptidbasierten Inhibitoren der Amyloidbildung, wie beschrieben von Eisenberg et al.<sup>[5]</sup> Die Atomstruktur eines kurzen, Fibrillen und Mikrokristalle bildenden Segmentes eines amyloiden Proteins wird durch Mikrokristallanalyse bestimmt. Der identifizierte sterische Reißverschluss (in der Basis des Trichters) wird anschließend als Templat eingesetzt, um Inhibitoren der Amyloidbildung mithilfe einer computergestützten Methode zu entwerfen (unterer Teil der Abbildung, unterhalb der Basis des Trichters). Die Inhibitoren wurden entworfen, a) um fest an vorhandene Amyloid- $\beta$ -Faltblätter zu binden und b) um die Addition weiterer Amyloidpeptid- $\beta$ -Stränge (Einschub rechts oben) über Seitenketten-vermittelte sterische Zusammenstöße zwischen dem Inhibitor (grüne Struktur im gelben Kreis; Einschub links oben) und dem Amyloidpeptid zu blockieren (Einschub links oben).

sterischer Hinderung sollten nun so genannte „sterische Zusammenstöße“ zwischen den Seitenketten der spezifisch eingeführten Aminosäurereste des Inhibitorpeptids und den Seitenketten eines sich dem oberen Ende des Reißverschlussmotivs annähernden Amyloidpeptid- $\beta$ -Stranges stattfinden, die zu einer Inhibition der weiteren Addition von Amyloidpeptid- $\beta$ -Strängen und somit der Fibrillenverlängerung führen sollten.

Die Kristallstruktur des fibrillenartigen sterischen Reißverschlusses, der vom Hexapeptidsegment VQIVYK des Tau-Proteins (Tau(306–311)) gebildet wird, wurde als ein erstes Templat verwendet, um Hexapeptide zu entwerfen, die ausschließlich aus D-Aminosäuren bestanden und als Tau-Fibrillierungsinhibitoren fungieren sollten. Die intrazelluläre Bildung neurofibrillärer Bündel (neurofibrillar tangles, NFTs), die hauptsächlich aus den fibrillären Aggregaten des Tau-Proteins bestehen und die extrazelluläre Ablagerung von Amyloidplaques, die aus fibrillären Aggregaten des  $\beta$ -Amyloidpeptides (A $\beta$ ) bestehen, sind die beiden zentralen histopathologischen Kennzeichen des Gehirns von Alzheimer-Patienten. Die Verwendung der VQIVYK-Struktur als Strukturtemplat beruhte auf seiner entscheidenden Rolle beim Selbstassoziationsprozess des Tau-Proteins sowie auf der Hypothese, dass sich diese Struktur auch in Amyloidfibrillen des Voll-Längen-Tau-Proteins bildet.<sup>[9]</sup>

Vier der entworfenen Peptide wurden als potenzielle Inhibitoren identifiziert. Ihre Wirkungen auf die Fibrillenbildung des VQIVYK-Templats und der zwei Tau-Protein-Konstrukte K19 und K12 (ca. 130 bzw. 150 Reste) wurden

transmissionselektronenmikroskopisch (TEM) und über den amyloidspezifischen Thioflavin-T-Bindungsassay untersucht. Das Hexapeptid D-TLKIVW wurde als der potenteste Inhibitor identifiziert. So inhibiert D-TLKIVW die Fibrillenbildung von sowohl VQIVYK als auch den beiden Tau-Konstrukten in einer dosisabhängigen und sequenzspezifischen Art und Weise. Dagegen beeinflusste das Diastereomer L-TLKIVW die Tau-Fibrillierung nicht, während D-TLKIVW keine Auswirkungen auf die Fibrillenbildung von A $\beta$  hatte. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass der inhibitorische Effekt von D-TLKIVW auf spezifische Wechselwirkungen zurückgeht. Biophysikalische Studien zu den inhibitorischen Effekten von D-TLKIVW, zu Fibrillverlängerungs-Geschwindigkeiten und zu seiner Wechselwirkung mit den fibrillären oder löslichen Zuständen der Taukonstrukte wiesen darauf hin, dass D-TLKIVW vorwiegend mit Amyloidfibrillen-artigen Aggregaten und nicht mit Monomeren wechselwirkt; für diese Wechselwirkung wurde eine Bindungsaffinität im niedrigen mikromolaren Bereich bestimmt. Schließlich wiesen TEM-Studien darauf hin, dass D-TLKIVW entsprechend dem Designkonzept in der Tat an die Enden der Fibrillen bindet.

Erste Hinweise auf eine breitere Anwendbarkeit des vorgestellten Inhibitor-Designansatzes wurden durch den Entwurf eines Inhibitors der Amyloidbildung des Proteins PAP(248–286) erzielt. PAP(248–286) ist ein proteolytisches Fragment des Spermienproteins Prostataspezifische Saure Phosphatase (PAP) und besteht aus dessen Resten 248–286. PAP(248–286) aggregiert und bildet Amyloidfibrillen. Diese können Virionen des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) „einfangen“ und erhöhen die Infektiosität von HIV drastisch, indem sie die Anheftung der Viren an die Zielzellen fördern.<sup>[10]</sup> Das entworfen Hexapeptid (abgekürzt WW61) basierte auf dem sterischen Reißverschluss von GGVLVN, einem Segment von PAP(248–286), und enthielt sowohl natürliche als auch nichtnatürliche L-Aminosäuren. Biophysikalische Studien zeigten, dass WW61 die Fibrillogenese von PAP(248–286) in vitro stark verzögert, wobei sein Inhibitor-effekt dosis- und sequenzabhängig ist. Vor allem aber verhinderte WW61 die PAP(248–286)-Fibrillen-abhängige Erhöhung der HIV-Infektiosität in einem funktionalen Assay-System. Diese Befunde zeigten, dass die Inhibition der PAP(248–286)-Amyloidbildung die HIV-Infektiosität unterdrücken kann, und führten zu einer Leitstruktur für die Entwicklung von Anti-HIV-Infektiva.

Insgesamt sind die Befunde der dargelegten Amyloidinhibitor-Designstrategie von Eisenberg et al. hoch interessant, da gezeigt wird, dass es möglich ist, peptidbasierte (und zukünftig vielleicht auch aus anderen Molekülklassen bestehende) Amyloidinhibitoren mithilfe einer computergestützten Designmethode zu entwerfen. Hierzu werden bekannte Strukturen kurzer, Fibrillen bildender Segmente amyloido-gener Proteine als Template verwendet. Dass das Design der Peptide, die sich als Amyloidinhibitoren erwiesen haben, auf dem Prinzip des sterischen Reißverschlusses basierte, spricht außerdem stark für das Vorkommen dieses Motivs in Amyloidfibrillen, wie bereits früher von der Eisenberg-Gruppe vorgeschlagen.<sup>[7,8]</sup> Die Charakterisierung der sterischen Reißverschlüsse auf atomarer Ebene ist inzwischen technisch

möglich. Durch das Designkonzept der Eisenberg-Gruppe sollte nun auch das Design großer Zahlen potenzieller Inhibitoren der Amyloidbildung für die verschiedenen krankheitsassoziierten Proteine zu einem erreichbaren Ziel geworden sein.<sup>[7,8]</sup> Da es sich bei diesen Amyloidinhibitoren um kurze Peptide handelt, die auch nichtnatürliche Aminosäuren enthalten können, sollten sie vielversprechende Kandidaten für Therapeutika bei Amyloidkrankheiten, nichtinvasive Amyloid-Diagnostika sowie Forschungswerkzeuge zur Untersuchung pathogener Proteinaufbauprozesse sein. In diesem Zusammenhang ist es nun wichtig, auch die Frage zu stellen, in welcher Weise diese neuen Inhibitoren die Bildung zytotoxischer Proteinaggregate beeinflussen. So könnte die Inhibition der Amyloidbildung durch Blockieren der Enden protofibrillärer Aggregate oder Fibrillen zu einer verringerten oder erhöhten Zelltoxizität führen, da sich sowohl niedrigere als auch höhere Mengen von zytotoxischen Aggregatarten bilden könnten.

Zwar ist derzeit noch nicht vorhersagbar, was bei diesen Studien herauskommen wird, allerdings lässt sich jetzt schon sagen, dass der von Eisenberg et al. präsentierte Designansatz den Weg geebnet hat, der zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der pathogenen Proteinaggregation und Amyloidbildung führen kann und zur Entwicklung neuer Moleküle mit biomedizinischer und therapeutischer Anwendbarkeit bei Amyloidkrankheiten beitragen sollte.

Eingegangen am 12. August 2011

Online veröffentlicht am 4. November 2011

- [1] P. Westermark, *FEBS J.* **2005**, 272, 5942–5949.
- [2] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333–366.
- [3] K. L. Sciarretta, D. J. Gordon, S. C. Meredith, *Methods Enzymol.* **2006**, 413, 273–312.
- [4] C. I. Stains, K. Mondal, I. Ghosh, *ChemMedChem* **2007**, 2, 1674–1697.
- [5] S. A. Sievers, J. Karanicolas, H. W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J. T. Stevens, J. Münch, D. Baker, D. Eisenberg, *Nature* **2011**, 475, 96–100.
- [6] B. Kuhlman, G. Dantas, G. C. Ireton, G. Varavi, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2003**, 302, 1364–1368.
- [7] R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. O. Madsen, C. Riek, R. Grothe, D. Eisenberg, *Nature* **2005**, 435, 773–778.
- [8] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riek, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, 447, 453–457.
- [9] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5129–5134.
- [10] J. Münch, E. Rücker, L. Ständker, K. Adermann, C. Goffinet, M. Schindler, S. Wildrum, R. Chinnadurai, D. Rajan, A. Specht, G. Gimenez-Gallego, P. Cuevas Sanchez, D. M. Fowler, A. Koulov, J. W. Kelly, W. Mothes, J.-C. Grivel, L. Margolis, O. T. Keppler, W.-G. Forssmann, F. Kirchhoff, *Cell* **2007**, 131, 1059–1071.