

Selektiv N-methylierte lösliche IAPP-Mimetika als potente IAPP-Rezeptoragonisten und nanomolare Inhibitoren der Selbstassoziation von IAPP und A β 40**

*Li-Mei Yan, Aleksandra Velkova, Marianna Tatarek-Nossol, Gerhard Rammes, Andrei Sibaev, Erika Andreetto, Michael Kracklauer, Maria Bakou, Eleni Malideli, Burkhard Göke, Jörg Schirra, Martin Storr und Aphrodite Kapurniotu**

Die Aggregation des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP) steht in Zusammenhang mit der Degeneration von β -Zellen und der Pathogenese von Typ-2-Diabetes (T2D).^[1] IAPP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das aus den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse sezerniert wird.^[1] In den Bauchspeicheldrüsen einer großen Zahl der Patienten, die unter T2D leiden, findet man Amyloidablagerungen, die hauptsächlich aus IAPP bestehen.^[1,2] Dennoch weist die lösliche Form des IAPP eine Funktion als ein Neuropeptid der „Hirn-Bauch-Achse“ auf, das die Glucosehomöostase reguliert.^[3,4] Die physiologischen Funktionen von IAPP umfassen hauptsächlich die Verlangsamung der Magenentleerung durch die Inhibition der Magenkontraktion und die Unterdrückung der Nahrungsaufnahme.^[3–6] IAPP-Rezeptoren sind GPCRs, die durch die Heterodimerisierung des Calcitoninrezeptors mit „rezeptoraktivitätsmodifizierenden“ Proteinen (RAMPs) entstehen.^[7–10] Aufgrund seiner Unlöslichkeit ist das IAPP-Molekül jedoch gänzlich ungeeignet für medizinische Anwendungen.^[4,11] Vor einigen Jahren wurde jedoch das lösliche IAPP-Analogon und IAPP-Rezeptoragonist [P25,P28,P29]-IAPP (oder Pramlintide) bei der Diabetes-Therapie zugelassen: Die Verwendung von Pramlintide

hat zur verbesserten Kontrolle des Blutzuckerspiegels geführt.^[4,10,11] Somit wurde in letzter Zeit die Anwendung von löslichen IAPP-Rezeptoragonisten bei der Behandlung von Diabetes zu einem vielversprechenden Ansatz.^[4,10,11]

Vor einiger Zeit haben wir das lösliche IAPP-Analogon IAPP-GI entworfen.^[12] IAPP-GI ist ein konformativ eingeschränktes IAPP-Mimetikum, das durch N-Methylierung der Amidbindungen von G24 und I26 entstanden ist. Letztere befinden sich innerhalb der minimalen IAPP-Selbsterkenungsregion IAPP(22–27) (Abbildung 1).^[12,13] IAPP-GI war bisher ein einzigartiges IAPP-Analogon, da es in der Lage ist,

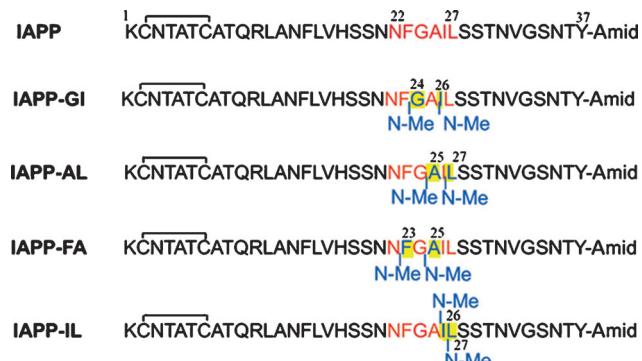


Abbildung 1. Primärstrukturen von IAPP, IAPP-GI und der neuen IAPP-Mimetika. Die Sequenz IAPP(22–27) ist in Rot dargestellt. Die N-Methylreste sind in Blau dargestellt, und die N-methylierten Aminosäuren sind in Blau dargestellt und in Gelb hervorgehoben.

die zelltoxische Selbstassoziation von IAPP im nanomolaren Bereich zu blockieren und darüber hinaus gleichzeitig ein löslicher, voller IAPP-Rezeptoragonist ist.^[12] Während die Anwesenheit der beiden N-Methylreste die hohe Löslichkeit von IAPP-GI und seine starke inhibitorische Wirkung auf die IAPP-Amyloidogenese bewirkt hat, hat sie jedoch auch seine Rezeptorbindungsbindungsaffinität und agonistische Aktivität stark abgeschwächt.^[12]

Vor kurzem haben wir gezeigt, dass IAPP-GI auch das β -Amyloidpeptid ($A\beta$) der Alzheimer-Krankheit (AD) mit hoher Affinität bindet und seine Amyloidogenese und Zelltoxizität unterdrückt.^[14,15] Darüber hinaus weisen neuere Befunde auf einen engen Zusammenhang zwischen AD und T2D hin. Die Entwicklung von Therapieansätzen, die gleichzeitig beide Krankheiten bekämpfen, könnte daher zu einem Forschungsgebiet von großer Aktualität

[*] Dr. L.-M. Yan, Dr. A. Velkova, Dr. E. Andreetto, Dipl.-Ing. M. Kracklauer, Dipl.-Biochem. M. Bakou, Dipl.-Chem. E. Malideli, Prof. Dr. A. Kapurniotu
Division of Peptide Biochemistry, Technische Universität München Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising (Deutschland)
E-Mail: akapurniotu@wzw.tum.de
Homepage: <http://pbch.wzw.tum.de/>

Dipl.-Chem. M. Tatarek-Nossol, Dipl.-Biochem. M. Bakou
Institute of Biochemistry and Molecular Cell Biology
RWTH Aachen University, Aachen (Deutschland)
Prof. Dr. G. Rammes
Department of Anesthesiology
Technische Universität München, Klinikum Rechts der Isar
Ismaninger Straße 22, 81675 München (Deutschland)

Dr. A. Sibaev, Prof. Dr. B. Göke, Prof. Dr. J. Schirra, Prof. Dr. M. Storr
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Klinikum der Universität München-Großhadern
Marchioninistraße 15, 81377 München (Deutschland)

[**] Wir danken A. Kazantzis für seine Beiträge zur Peptidsynthese, A. Kastenmüller und S. Weinkauf für Hilfe bei der TEM und J. Bernhagen für hilfreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). IAPP = Insel-Amyloid-Polypeptid.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302840> zu finden.

werden.^[1,4,16,17] So könnten lösliche IAPP-Analoga, die potente Inhibitoren der Aggregation und Zelltoxizität von IAPP und A β 40 und darüber hinaus auch noch potente IAPP-Rezeptoragonisten sind, Leitstrukturen für die Entwicklung solcher Therapeutika werden. Allerdings ist der molekulare Mechanismus der IAPP-Rezeptoraktivierung bisher noch nicht aufgeklärt worden.

Hier zeigen wir, dass es möglich ist, durch selektive N-Methylierung ausgewählter Peptidbindungen innerhalb der Sequenz IAPP(22–27), lösliche IAPP-Mimetika zu erzeugen, die die Aggregation und Zelltoxizität von IAPP und A β 40 mit einer Affinität im nanomolaren Bereich, wie IAPP-GI, inhibieren können und darüber hinaus einen stark verbesserten Rezeptoragonismus im Vergleich zu IAPP-GI aufweisen. Die IAPP-Mimetika verfügen außerdem über eine deutlich höhere Proteolysestabilität im humanen Blutplasma als IAPP. Darüber hinaus inhibiert das Mimetikum mit dem stärksten In-vitro-Rezeptoragonismus auch die Kontraktionen der Magenmuskulatur ex vivo mit einer Aktivität, die identisch zur Aktivität des Ratten-IAPP (rIAPP) ist. rIAPP ist das potenteste natürliche IAPP-Analogon. Schließlich zeigen unsere Befunde, dass dieses Mimetikum auch in der Lage ist, die Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität im Hippocampus, die durch A β 40-Aggregate hervorgerufen wird, komplett zu unterdrücken.

Zum Design der Mimetika wurden die beiden N-Methylreste, die im IAPP-GI vorhanden sind, auf andere Amidbindungen innerhalb der Sequenz IAPP(22–27) platziert.^[12] Entsprechend wurden zwei Analoga mit alternierenden [(N-Me)A25, (N-Me)L27]-IAPP (IAPP-AL) und [(N-Me)F23, (N-Me)A25]-IAPP (IAPP-FA)) und ein Analog mit aufeinanderfolgenden N-Methylierungen [(N-Me)I26, (N-Me)L27]-IAPP (IAPP-IL)) entworfen, synthetisiert und untersucht (Abbildung 1).

Zunächst haben wir die Löslichkeit, die Selbstassoziationstendenz, Amyloidogenität und Zelltoxizität der Mimetika anhand verschiedener biophysikalischer Testsysteme untersucht. Die neuen Mimetika erwiesen sich, ähnlich zum IAPP-GI, als mindestens um das Hundertfache löslicher (pH 7.4), weniger amyloidogen und weniger zelltoxisch als IAPP (Abbildung 2).^[12] Dennoch aggregierten sie wie IAPP-GI auch zu löslichen, nichtfibrillären und nichttoxischen Oligomeren im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbe-

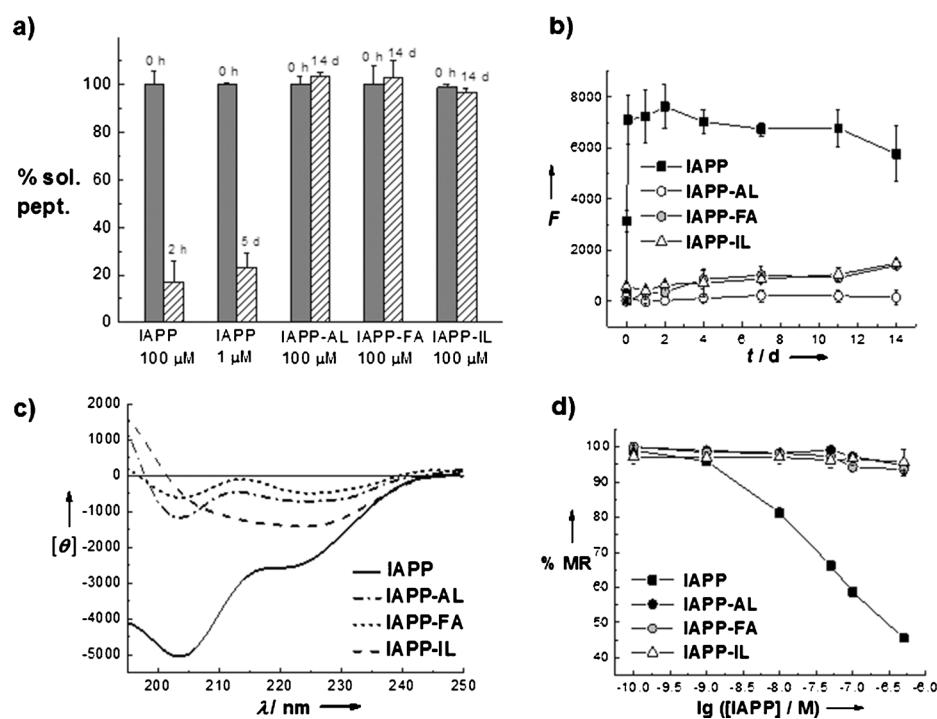


Abbildung 2. Löslichkeit (a), Amyloidogenität (b), Konformation (c) und Effekte auf Zellvitalität (d) der Mimetika und IAPP.^[12] a) Die Löslichkeiten (100 μ M) wurden durch einen Sedimentationsassay ermittelt. Die früher ermittelte Löslichkeit von IAPP (1 und 100 μ M) wurde mitgezeichnet.^[12] Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus 3–5 Assays (% sol. pept.: % Peptid in Lösung). b) Die Amyloidogenitäten wurden mit dem ThT-Bindungsassays bestimmt (62.5 μ M). Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus 3 Assays (F: ThT-Fluoreszenz). c) Fern-UV-CD-Spektren von IAPP und der Mimetika (5 μ M, wässriger Puffer, pH 7.4). d) Die Effekte von gealterten (7 Tage) Lösungen von IAPP oder Mimetika auf die Vitalität der Zellen der Ratteninsulinom-Zelllinie RIN5fm wurden durch den 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid(MTT)-Reduktionsassay bestimmt (%MR: MTT-Reduktion, % der Kontrolle). Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus 3 Assays (je $n = 3$).

reich (Abbildung 2c; siehe auch Abbildung S1 und Text in den Hintergrundinformationen).^[12]

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die IAPP-Selbstassoziation zu nichtfibrillären und nichttoxischen Aggregaten durch einen gewissen Polymorphismus auszeichnet, und dass sie von der Wasserstoffbrücken- und β -Faltblattbildungsfähigkeit der Sequenz IAPP(22–27) unabhängig ist. Dagegen scheint die IAPP-Missfaltung, die ja zu zelltoxischen Oligomeren und Amyloidfibrillen führt, eng mit der β -Faltblattbildungsfähigkeit von IAPP(22–27) zusammenzuhängen. Letzterer Befund ist in Einklang mit Modellen der IAPP-Fibrille (siehe die Hintergrundinformationen).^[13,15,18,19]

Als nächstes untersuchten wir, ob IAPP-AL und IAPP-FA die Selbstassoziation von IAPP inhibieren können. In der Tat wurde in der Gegenwart von IAPP-AL und IAPP-FA (1:1) eine starke Abnahme der Amyloidbildung von IAPP mit einem Thioflavin-T(ThT)-Bindungsassay und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) festgestellt (Abbildung 3a, Abbildung S2).^[12,20] Darüber hinaus deuteten unsere Befunde anhand des MTT-Reduktionsassays in der RIN5fm-Zelllinie auf eine starke Abnahme der durch die IAPP-Aggregation induzierten Zellschädigung hin (Abbildung 3b).^[21] Titrationen zelltoxischer IAPP-Spezies mit IAPP-AL und IAPP-FA zeigten, dass eine maximale Inhibition durch ein molares Verhältnis von 1:1 erreicht wird. Au-

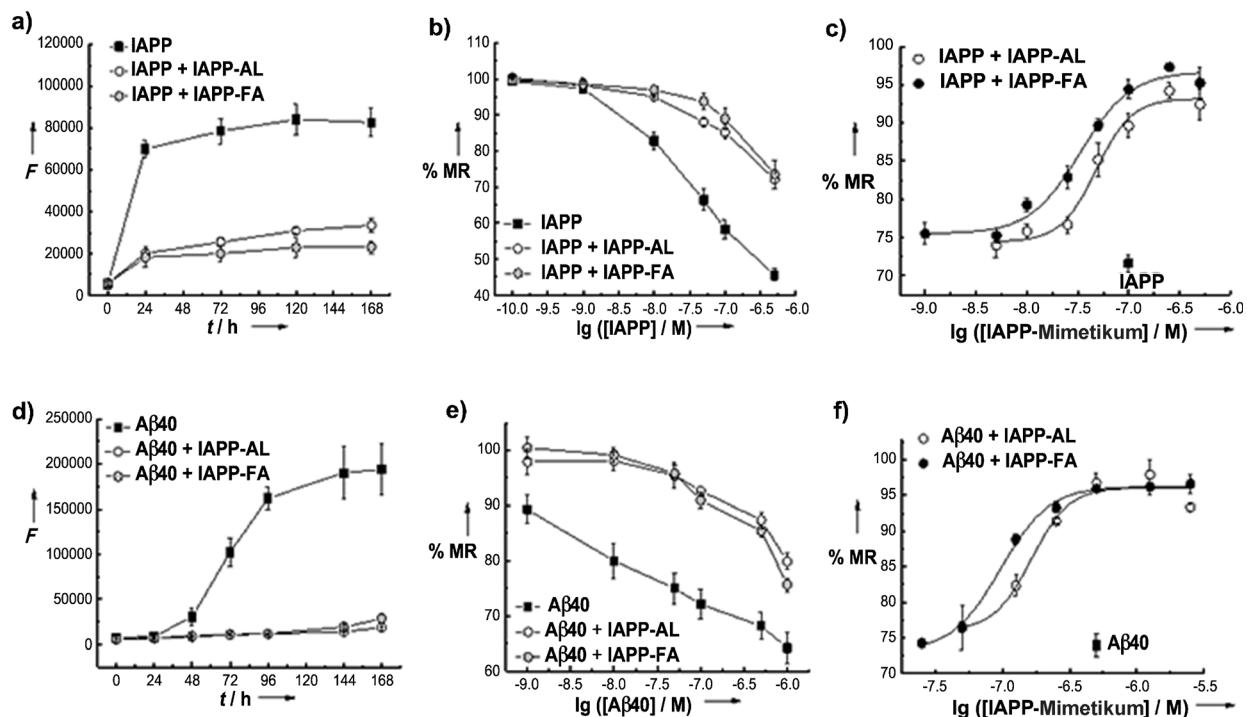


Abbildung 3. Inhibitorische Wirkung von IAPP-AL und IAPP-FA auf die Aggregation von IAPP (a–c) oder Aβ40 (d–e). a) Wirkung auf die Fibrillogenese von IAPP. IAPP ($16.5 \mu\text{M}$) wurde alleine oder mit dem Mimetikum (1:1) gealtert, und die Fibrillogenese wurde mit dem ThT-Bindungsassay gemessen. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus 6 Assays. b) Effekte der Mimetika auf die IAPP-Aggregation. Gealterte (7 Tage) IAPP-Lösungen oder Mischungen von IAPP mit den Mimetika (von 3a) wurden zu RIN5fm-Zellen gegeben und die Zellschädigung mit dem MTT-Reduktionsassay ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus 3 Assays (je $n=3$). c) Bestimmung des IC_{50} -Wertes von IAPP-AL und IAPP-FA in Bezug auf die Inhibition der IAPP-Zelltoxizität durch Titration von IAPP (100 nM) mit den Mimetika und den MTT-Reduktionsassay. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus 3 Assays (je $n=3$). d) Fibrillogenese von Aβ40 ($16.5 \mu\text{M}$) allein oder mit den Mimetika (1:1) wurde mit dem ThT-Bindungsassay gemessen. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus 3 Assays. e) Wirkung der Mimetika auf die Aβ40-Zelltoxizität. Gealterte Lösungen von Aβ40 oder seiner Mischungen mit Mimetika (7 Tage gealtert; aus (d)) wurden zu Zellen der Rattenphäochromozytom-Zelllinie zugegeben und die Zellschädigung mit dem MTT-Reduktionsassay bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus 3 Assays (je $n=3$). f) IC_{50} -Wert von IAPP-AL und IAPP-FA in Bezug auf die inhibitorische Wirkung auf die Zelltoxizität von Aβ40 bestimmt durch Titration von Aβ40 (500 nM) mit Mimetika und den MTT-Reduktionsassay. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) aus 3 Assays (je $n=3$).

Berdem ergaben diese Titrationen IC_{50} -Werte von $48(\pm 6)$ nM (für IAPP-AL) und $33(\pm 1)$ nM (für IAPP-FA), die dem IC_{50} -Wert des IAPP-GI sehr ähnlich sind (Abbildung 3c).^[12]

Anschließend haben wir die Wechselwirkung von IAPP-AL und IAPP-FA mit IAPP mithilfe von Fern-UV-CD-Spektroskopie, TEM und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Mimetika IAPP-Monomere und niedermolekulare -Oligomere mit Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich binden und sie dadurch in lösliche, nichtfibrilläre und geordnete Heterooligomere überführen (Text und Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Die ermittelten Affinitäten stimmten mit den IC_{50} -Werten überein und waren fast identisch zur Affinität des IAPP-GI (Tabelle S1).^[12] Diese Befunde wiesen darauf hin, dass die N-Methylierungen innerhalb der Sequenz IAPP(22–27) weder die Bindungsaffinitäten noch die IC_{50} -Werte beeinträchtigen.

Als nächstes wurden IAPP-AL und IAPP-FA (1:1) zu nichtfibrillären und nichttoxischen Aβ40-Spezies zugegeben. Es stellte sich heraus, dass die beiden Peptide die Aβ40-Fibrillogenese und die Bildung zelltoxischer Aβ40-Aggregate blockierten (Abbildung 3d,e und Abbildung S4). Titrationen von zelltoxischen Aβ40-Spezies mit den Mimetika deuten

darauf hin, dass eine 1:1-Wechselwirkung zur maximalen inhibitorischen Wirkung führt. Es wurden IC_{50} -Werte von $164(\pm 27)$ nM und $96(\pm 3)$ nM für IAPP-AL bzw. IAPP-FA bestimmt (Abbildung 3f). Untersuchungen mit Fern-UV-CD-Spektroskopie, TEM und Fluoreszenzspektroskopie zeigten, dass die Mimetika Aβ40-Monomere und niedermolekulare -Oligomere mit Affinitäten im nanomolaren Bereich binden, wodurch sich lösliche, nichtfibrilläre und geordnete Heterooligomere bilden (Abbildungen S4 und S5 und Tabelle S1). Interessanterweise zeigten die Untersuchungen mit dem konsekutiv N-methylierten IAPP-IL, dass es fast identische Eigenschaften zu anderen Mimetika hat (Abbildungen S2, S4, S6 und S7, Tabelle S1). Schließlich stellte es sich heraus, dass die Mimetika die Fibrillogenese von IAPP und Aβ40 auch blockieren können, wenn sie nach der Nukleation der Fibrillogenese zugegeben werden, und dass sie in der Lage sind, große Teile bereits gebildeter Fibrillen und zelltoxischer Aggregate in nichtfibrilläre und weniger toxische Spezies umzuwandeln. Letzterer Prozess scheint durch Dissoziations- und Umstrukturierungsprozesse der vorhandenen Aggregate stattzufinden (Abbildungen S8–S20).^[12, 14]

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse unserer früheren und der hier präsentierten Untersuchungen darauf schließen,

dass zwischen den Mimetika und IAPP bzw. A β 40 hochaffine, polymorphe Wechselwirkungen stattfinden.^[12,14] Diese Wechselwirkungen führen möglicherweise zu einer Sequenzierung von nichtfibrillären und nichttoxischen A β 40- und IAPP-Spezies in Form nichtfibrillärer und nichttoxischer Heterooligomere und zur Dissoziation und Umstrukturierung vorhandener Fibrillen und zelltoxischer Aggregate zu Aggregaten, die weniger fibrillär und zelltoxisch sind (siehe Abbildung S20 und Tabelle S2).^[12,14,15] Unsere Befunde sind in Einklang mit vorhandenen Modellen von IAPP-Aggregaten und mit einer kritischen Rolle der Region IAPP(22–27) nicht nur bei der IAPP-Selbst- sondern auch bei seiner Heteroassoziation mit A β 40.^[13–15,18,19,22] Darüber hinaus deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass unterschiedliche konformativeme Merkmale der nicht-amyloidogenen Selbst- oder Heteroassoziation von IAPP mit A β 40 verglichen zu seiner amyloidogenen Selbstassoziation zugrunde liegen, obgleich die selben IAPP-Regionen an allen obigen Wechselwirkungen teilzunehmen scheinen.^[15]

Anschließend untersuchten wir die biologische Aktivität der Mimetika anhand der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7, die hochaffine IAPP-Rezeptoren exprimiert.^[8] Als erstes wurden die Rezeptorbindungsaffinitäten der Mimetika durch die kompetitive Inhibition der spezifischen Rezeptorbindung von radioaktiv-markiertem rIAPP ermittelt. Letzteres ist ja ein bekannter hochaffiner IAPP-Rezeptorligand.^[8,9,12] Alle drei Mimetika wiesen höhere Rezeptorbindungsaffinitäten als IAPP-GI auf (Abbildung 4a).^[12] Dabei wurde für IAPP-IL eine 10-fach, für IAPP-AL eine 7-fach und für IAPP-FA eine 3-fach erhöhte Bindungsaffinität verglichen zum IAPP-GI ermittelt (Abbildung 4a und Tabelle S3).

Dann wurden die rezeptoragonistischen Aktivitäten der Mimetika durch die Bestimmung der Adenylylcyclaseaktivierung anhand der MCF-7-Zelllinie ermittelt (Abbildung 4b).^[8] Alle Mimetika stellten sich als volle Agonisten heraus. Von großer Bedeutung war der Befund, dass IAPP-AL 3-fach stärker agonistisch wirkte als IAPP. In der Tat war

seine Aktivität fast identisch zur Aktivität vom rIAPP. Die Aktivitäten von IAPP-IL und IAPP-FA waren ähnlich zur Aktivität vom IAPP.^[8,12] Im Vergleich zum IAPP-GI, wies IAPP-AL eine 19-fach erhöhte Aktivität auf, wobei die Aktivitäten von IAPP-FA und IAPP-IL um das 4-fache erhöht waren (Abbildung 4b und Tabelle S3).^[12] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass IAPP-AL der bislang potenteste entworfene IAPP-Rezeptoragonist ist und deckten zugleich die äußerst wichtige Rolle der Region IAPP(22–27) für die Bioaktivität von IAPP auf.^[8,9]

Die Inhibition der Kontraktionen der Magenmuskulatur liegen der verlangsamenden Wirkung von IAPP auf die Magenentleerung zugrunde.^[4,10,11,23] Daher untersuchten wir als nächstes die Wirkung von IAPP-AL, rIAPP und IAPP auf die Kontraktionen glatter Magenmuskulatur, die aus der Maus isoliert wurde.^[5] Alle drei Peptide wiesen eine signifikante, konzentrationsabhängige, abschwächende Wirkung auf Magenkontraktionen, die durch elektrische Feldstimulation (EFS) hervorgerufen wurden, auf (Abbildung 4c). Der wichtigste Befund dieser Untersuchungen jedoch war, dass IAPP-AL und rIAPP identische Dosis-Wirkungskurven zeigten, wobei humanes IAPP eine deutlich schwächere Wirkung hatte (Abbildung 4c).

Die synaptische Plastizität ist eine notwendige Voraussetzung für Lern- und Gedächtnisprozesse und ihre Beeinträchtigung im Hippocampus scheint eine Hauptrolle bei der Pathogenese der AD zu spielen.^[24,25] Die Langzeit-Potenzierung (LTP) beschreibt die dauerhafte Verstärkung der synaptischen Übertragung nach hochfrequenter Stimulation und gilt als ein zellulärer Hauptmechanismus für Lernen und Gedächtnis.^[24,25] Daher haben wir als nächstes untersucht, ob IAPP-AL in frisch präparierten Maushirnschnitten die durch A β 40-Aggregate hervorgerufene LTP-Beeinträchtigung blockieren kann.^[26,27] Die hippocampalen Hirnschnitte wurden mit A β 40-Aggregaten behandelt und LTP in CA1-Neuronen wurde durch hochfrequente elektrische Stimulation (hochfrequente Stimulation, HFS) induziert.^[27] Unter Kontrollbe-

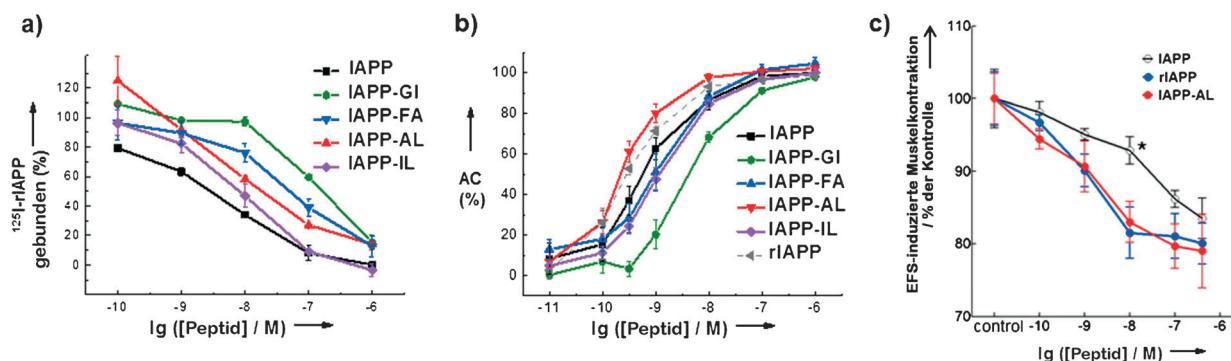


Abbildung 4. In-vitro- und Ex-vivo-Aktivitäten von IAPP, rIAPP, und den IAPP-Mimetika. a,b) In-vitro-Bindungsassays und -Aktivierungspotenziale des humanen IAPP-Rezeptors, bestimmt anhand von Zellen der MCF-7-Zelllinie. Die früher ermittelten Aktivitäten von IAPP und IAPP-GI sind mitgezeichnet.^[12] a) Rezeptorbindungsaffinitäten wurden durch kompetitive Inhibition der Rezeptorbindung des 125 I-rIAPP durch IAPP oder die Mimetika bestimmt. Aufgetragen wurden spezifisch gebundenes 125 I-rIAPP gegen die Konzentration von IAPP oder der Mimetika. Die Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus 2 Assays ($n=4$). b) Adenylylcyclaseaktivierung wurde durch die Quantifizierung von intrazellulärem cAMP bestimmt. Gezeigt ist die Adenylylcyclaseaktivität (AC) über das Grundniveau gegen die Peptidkonzentration. Die Ergebnisse sind Mittelwerte (\pm SEM) aus 3 Assays (je $n=2$). c) Dosis-Wirkungs-Kurve des inhibitorischen Effekts von IAPP, rIAPP und IAPP-AL auf die Kontraktionen isolierter glatter Magenmuskulatur der Maus. Die ermittelten inhibitorischen Wirkungen ($p < 0.05$) aller getesteten Peptidkonzentrationen waren signifikant verglichen zur Kontrolle ($n=6$). Die Unterschiede zwischen den Effekten von 10 nM IAPP(*) und IAPP-AL ($p=0.044$, $n=6$) oder rIAPP ($p=0.025$, $n=6$) waren auch signifikant.

dingungen (in der Abwesenheit von A β 40) wurden die exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentiale (fEPSP) 60 min nach HFS zu 138% potenziert (Abbildung 5a,b). Nach Behandlung mit A β 40 produzierte der gleiche Stimulus jedoch nur eine Kurzzeit-Potenzierung und, in Einklang mit einer LTP-Blockade, verringerte sich die Steigung der fEPSPs nach 60 min wieder auf 108% des Ausgangsniveaus zurück (Abbildung 5a,b). In Gegenwart eines Gemisches aus A β 40 und IAPP-AL hingegen blieb die LTP erhalten (Abbildung 5a,b). Diese Ergebnisse belegten, dass IAPP-AL die Beeinträchtigung der hippocampalen LTP, die durch die Aggregation von A β 40 hervorgerufen wird, komplett unterbinden kann.

Peptide sind bekanntermaßen sehr anfällig für proteolytische Abbauprozesse in Körperflüssigkeiten. Dennoch haben wir aufgrund der N-Methylierungen erwartet, dass sich die Mimetika durch verbesserte proteolytische Stabilitäten

auszeichnen.^[28] Um diese Hypothese zu testen, wurden Inkubationen im humanen Blutplasma bei 37°C angesetzt, und nichtabgebaute Peptide wurden mit SDS-PAGE und Western-Blot quantifiziert (Abbildung 5c,d). Es stellte sich heraus, dass IAPP schnell, mit einer Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von unter 1 h, abgebaut wird (Abbildung 5c,d). Dagegen lagen die $T_{1/2}$ von IAPP-AL, IAPP-IL und IAPP-GI bei 7–8 h und die $T_{1/2}$ von IAPP-FA bei ca. 6 h (Abbildung 5c,d). Zusammenfassend erwiesen sich die $T_{1/2}$ aller Mimetika um das 6- bis 8-fache erhöht verglichen zur $T_{1/2}$ von IAPP. Interessanterweise lag die $T_{1/2}$ von [P25,P28,P29]-IAPP bei ca. 5 h (Abbildung 5c,d). Diese Ergebnisse wurden auch mit HPLC- und MALDI-MS-Messungen bestätigt. Daraus lässt sich schließen, dass alle Mimetika stark erhöhte proteolytische Stabilitäten im Vergleich zu IAPP aufweisen und bei drei davon die $T_{1/2}$ sogar länger als beim [P25,P28,P29]-IAPP sind.

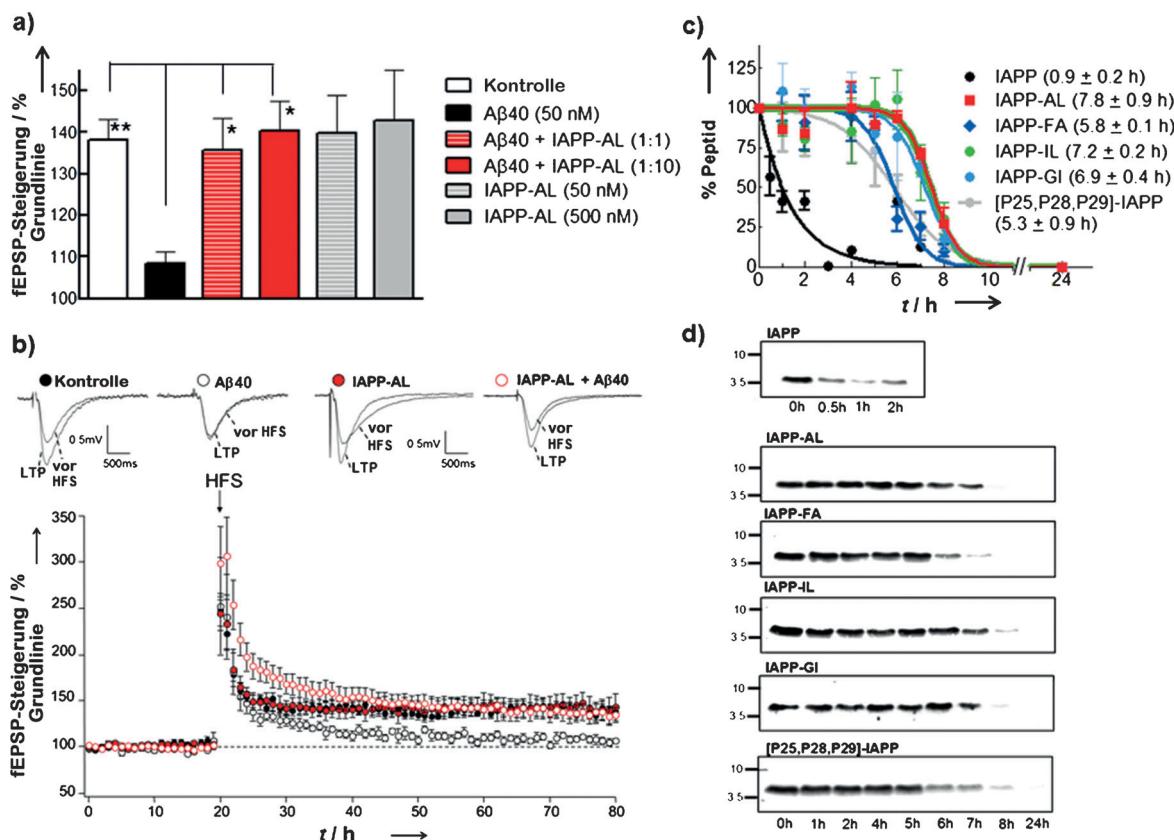


Abbildung 5. Wirkung von IAPP-AL auf die A β 40-induzierte Beeinträchtigung der hippocampalen LTP (a,b) und proteolytische Stabilitäten der Mimetika, IAPP und [P25,P28,P29]-IAPP in humanem Blutplasma in vitro (c,d). a) Wirkung von Kontrolle, A β 40-Aggregaten (50 nM), Mischungen von A β 40 und IAPP-AL (1:1 oder 1:10) und von IAPP-AL auf LTP in akuten Hippocampus-Hirnschnitten der Maus. Die Größe der LTP wird dargestellt als die durchschnittliche Steigung der fEPSPs gemittelt über die letzten 10 min (Mittelwerte (\pm SEM)). Signifikant war die Wirkung von A β 40 gegen Kontrolle ($p < 0.01$; $n = 7$) und der Mischung von A β 40 mit IAPP-AL (1:1 und 1:10; $p < 0.05$; $n = 7$ und $n = 6$). Kontrollen $n = 9$; IAPP-AL (500 nM) $n = 5$ und IAPP-AL (50 nM) $n = 6$. b) LTP-Messungen (Peptide wie angezeigt): A β 40 (50 nM) wurde 90 min vor LTP-Induktion durch HFS (Pfeil) appliziert. Die beobachteten Wirkungen (% der Kontrolle der fEPSP-Steigung) wurden für die nächsten 60 min gemessen. In Gegenwart von IAPP-AL (500 oder 50 nM) wurde die LTP-Beeinträchtigung, die durch die A β 40 Aggregate hervorgerufen wird, unterbunden. IAPP-AL (500 nM) alleine hatte keine Wirkung. Repräsentative fEPSPs vor und nach HFS sind gezeigt. Die horizontale Kalibrierung war 500 ms und die vertikale Kalibrierung 0.5 mV. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm SEM) dargestellt. c) Ermittlung der Stabilität der Peptide gegenüber proteolytischen Abbau in humanem Blutplasma durch Inkubation in Blutplasma (37°C) und Quantifizierung des intakten Peptides an bestimmten Inkubationszeitpunkten anhand von NuPAGE und Western-Blot (WB) mit Anti-IAPP-Antikörper. Übrig gebliebenes Peptid (%) wird gegen die Inkubationszeit aufgetragen; $T_{1/2}$ sind in Klammern gezeigt. Daten sind Mittelwerte (\pm SEM) aus 3–4 Assays (mit Ausnahme der IAPP-Werte für $t \geq 3$ h). d) Repräsentative WBs sind gezeigt, die nach NuPAGE von Peptidinkubationen der in humanem Blutplasma (wie in (c)), Ansäuerung der Lösungen und Entfernung von Plasmaproteinen durchgeführt wurden (100% bei 0 h: 3 μ g).

Zusammenfassend stellen die entworfenen multifunktionalen IAPP-Mimetika eine einzigartige Klasse von IAPP-Analoga dar, indem sie (a) löslich, nichtamyloidogen und nichttoxisch sind; (b) ausgesprochen stabil gegenüber proteolytischen Abbauprozessen in humanem Blutplasma sind; (c) potente IAPP-Rezeptoragonisten sind; und (d) Inhibitoren der zelltoxischen Selbstassoziation und Amyloidogenese der beiden Polypeptide IAPP und A β 40 mit einer Affinität im nanomolaren Bereich sind. Im Vergleich dazu ist unter den anderen bekannten löslichen IAPP-Analoga IAPP-GI ein nur schwacher Rezeptoragonist, während rIAPP kaum oder nur schwach mit der zelltoxischen Selbstassoziation von IAPP oder A β 40 intervenieren kann.^[12,14,29] Darüber hinaus gab es bisher keine Berichte über potentielle Wirkungen von [P25,P28,P29]-IAPP oder anderer IAPP-Analoga auf IAPP- oder A β 40-Zelltoxizität.^[30] In der Tat ist der rIAPP-Abkömmling [P25,P28,P29]-IAPP bis heutzutage der einzige therapeutisch applizierte lösliche IAPP-Rezeptoragonist.^[4,10,11] Fernerhin kann man bezüglich der kurzen N-methylierten Aggregationsinhibitoren, die aus den IAPP- oder A β 40-Sequenzen stammen, vorhersagen, dass sie nicht in der Lage sein werden, die Aggregation und Zelltoxizität beider Peptide zu blockieren und gleichzeitig als IAPP-Rezeptoragonisten zu fungieren.^[31–36]

Die translationale Relevanz dieser Daten wird über die Ex-vivo-Untersuchungen an Maus-Organpräparaten deutlich. So wurde gezeigt, dass IAPP-AL ein potenter Inhibitor der Magenkontraktion ist und dass es die durch A β 40-Aggregate hervorgerufene Beeinträchtigung der hippocampalen synaptischen Plastizität unterbinden kann. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass IAPP-AL die entsprechenden Effekte auch in vivo aufweisen könnte und somit einerseits die Magenentleerung verlangsamen und andererseits die mit AD zusammenhängende Fehlfunktion der Synapsen im Gehirn unterdrücken könnte. Sollte sich diese Hypothese bewahrheiten, könnten IAPP-AL und andere IAPP-Mimetika mit ähnlichen Eigenschaften vielversprechende Kandidaten für die Behandlung von T2D und AD werden. Entsprechende In-vivo-Untersuchungen an geeigneten Tiermodellen sind nun von hoher Priorität.

Eingegangen am 5. April 2013,
veränderte Fassung am 8. Juni 2013
Online veröffentlicht am 19. August 2013

Stichwörter: IAPP-Rezeptoragonist · Insel-Amyloid-Polypeptid · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Selbstassoziation · β -Amyloid-Peptid

- [1] P. Westermark, A. Andersson, G. T. Westermark, *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 795–826.
- [2] P. Westermark, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5942–5949.
- [3] T. A. Lutz, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *298*, R1475–R1484.
- [4] O. Schmitz, B. Brock, J. Rungby, *Diabetes* **2004**, *53*, S233–S238.
- [5] H. Mulder, M. Ekelund, E. Ekblad, F. Sundler, *Peptides* **1997**, *18*, 771–783.

- [6] A. A. Young, B. R. Gedulin, T. J. Rink, *Metabolism* **1996**, *45*, 1–3.
- [7] M. Morfis, N. Tilakaratne, S. G. Furness, G. Christopoulos, T. D. Werry, A. Christopoulos, P. M. Sexton, *Endocrinology* **2008**, *149*, 5423–5431.
- [8] U. Zimmermann, B. Fluehmann, W. Born, J. A. Fischer, R. Muff, *J. Endocrinol.* **1997**, *135*, 423–431.
- [9] R. J. Bailey, C. S. Walker, A. H. Ferner, K. M. Loomes, G. Prijic, A. Halim, L. Whiting, A. R. Phillips, D. L. Hay, *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 151–167.
- [10] J. D. Roth, H. Maier, S. Chen, B. L. Roland, *Arch. Neurol.* **2009**, *66*, 306–310.
- [11] H. E. Lebovitz, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2010**, *6*, 326–334.
- [12] L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2046–2051.
- [13] K. Tenidis, M. Waldner, J. Bernhagen, W. Fischle, M. Bergmann, M. Weber, M.-L. Merkle, W. Voelter, H. Brunner, A. Kapurniotu, *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 1055–1071.
- [14] L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1268–1274; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1246–1252.
- [15] E. Andreetto, L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, R. Frank, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3146–3151; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3081–3085.
- [16] K. Akter, E. A. Lanza, S. A. Martin, N. Myronyuk, M. Rua, R. B. Raffa, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *71*, 365–376.
- [17] L. Li, C. Hölscher, *Brain Res. Rev.* **2007**, *56*, 384–402.
- [18] N. F. Dupuis, C. Wu, J. E. Shea, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7240–7243.
- [19] J. J. Wiltzius, S. A. Sievers, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1521–1530.
- [20] H. LeVine III, *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274–284.
- [21] M. S. Shearman, S. R. Hawtin, V. J. Tailor, *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 218–227.
- [22] S. Luca, W. M. Yau, R. Leapman, R. Tycko, *Biochemistry* **2007**, *46*, 13505–13522.
- [23] M. Horowitz, D. O'donovan, K. L. Jones, C. Feinle, K. C. Rayner, M. Samsom, *Diabetic Med.* **2002**, *19*, 177–194.
- [24] T. Ma, E. Klann, *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 140–148.
- [25] G. M. Shankar, D. M. Walsh, *Mol. Neurodegener.* **2009**, *4*, 48.
- [26] D. M. Walsh, M. Townsend, M. B. Podlisny, G. M. Shankar, J. V. Fadeeva, O. El Agnaf, D. M. Hartley, D. J. Selkoe, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 2455–2462.
- [27] H. Martinez-Coria, K. N. Green, L. M. Billings, M. Kitazawa, M. Albrecht, G. Rammes, C. G. Parsons, S. Gupta, P. Banerjee, F. M. LaFerla, *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 870–880.
- [28] J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331–1342.
- [29] C. T. Middleton, P. Marek, P. Cao, C. C. Chiu, S. Singh, A. M. Woys, J. J. de Pablo, D. P. Raleigh, M. T. Zanni, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 355–360.
- [30] A. Abedini, F. Meng, D. P. Raleigh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11300–11301.
- [31] E. Andreetto, L. M. Yan, A. Caporale, A. Kapurniotu, *Chem-BioChem* **2011**, *12*, 1313–1322.
- [32] E. Hughes, R. M. Burke, A. J. Doig, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25109–25115.
- [33] M. Tatarek-Nossol, L. M. Yan, A. Schmauder, K. Tenidis, G. Westermark, A. Kapurniotu, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 797–809.
- [34] K. L. Sciarretta, D. J. Gordon, S. C. Meredith, *Methods Enzymol.* **2006**, *413*, 273–312.
- [35] D. J. Gordon, K. L. Sciarretta, S. C. Meredith, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237–8245.
- [36] R. Scherzer-Attali, R. Shaltiel-Karyo, Y. H. Adalist, D. Segal, E. Gazit, *Proteins* **2012**.