

NMR-Spektroskopie in Kombination mit dynamischer Kernpolarisation enthüllt mehrere Konformationen in Lipid-verankerten Peptid-Impfstoffen**

Eline J. Koers, Maria Pilar López-Deber, Markus Weingarth, Deepak Nand, David T. Hickman, Dorin Mlaki Ndao, Pedro Reis, Anne Granet, Andrea Pfeifer, Andreas Muhs und Marc Baldus*

Viele pharmakologische Eigenschaften von konventionellen Medikamenten können durch Trägersysteme verbessert werden, die hauptsächlich aus Polymeren oder Lipiden bestehen.^[1] Liposomen haben sich zu vielseitigen Trägersystemen für die Induktion von Antikörper- und T-Lymphozytreaktionen auf entsprechende Antigenuntereinheiten entwickelt.^[2] Die resultierende Immunreaktion hängt von den strukturellen und physikochemischen Eigenschaften der liposomalen Impfstoffe ab. Biophysikalische Methoden wie Circular dichroismus (CD) oder ATR-Infrarotspektroskopie (ATR = abgeschwächte Totalreflexion) sind zur Untersuchung von liposomalen Impfstoffen oder anderer Wirkstoff-Trägersysteme verwendet worden (siehe z.B. Lit. [3]). Die Festkörper-NMR(fkNMR)-Spektroskopie gibt Einblicke in Liposomen sowie in die mit ihnen assoziierten Peptide und Proteine auf atomarer Ebene.^[4] Die bisher notwendigen hohen Polypeptidkonzentrationen sind aber oft nicht verträglich mit der Formulierung der liposomalen Impfstoffe.

Wir untersuchten den Nutzen der fkNMR-Spektroskopie in Kombination mit dynamischer Kernpolarisation (DNP-kfNMR-Spektroskopie, Lit. [5]) an liposomalen Impfstoffen gegen Alzheimer. Frühere Arbeiten^[3,6] hatten gezeigt, dass das Lipid-verankerte tetrapalmitoylierte β -Amyloid-1–15-Peptid (Palm1–15) zusammen mit Monophosphoryl-Lipid A (MPLA) eine Immunreaktion verursachen kann, die kognitives Fehlverhalten von APP-transgenen Mäusen korrigiert (APP = Amyloid Precursor Protein). Biophysikalische und eindimensionale fkNMR-spektroskopische Experimente an Palm1–15, dass einheitlich mit $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ an den Positionen Ala2, Ser8 und Gly9 [Palm1–15(ASG); Abbildung 1] markiert war, sprachen dafür, dass das Peptid eine gestreckte Rückgratkonformation annimmt, die durch die Lipidumge-

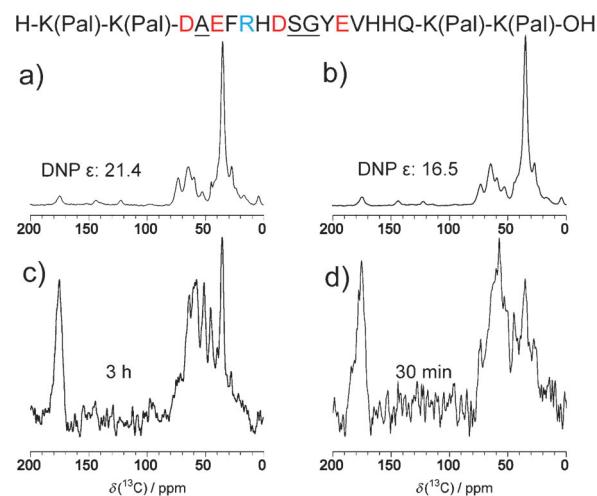


Abbildung 1. Oben: Palm1–15(ASG)-Peptidsequenz; $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte Aminosäuren unterstrichen, geladene Reste (bei pH 7) farbig markiert; blau: positiv geladen, rot: negativ geladen. 1D-NMR-Spektren von liposomalem Palm1–15 in DMPC/DMPG/Chol (a,c) oder DMTAP/Chol (b,d). CP-MAS-Daten bei 100 K sind in (a) und (b) gezeigt, die 1D-2QF-Spektren (mit einer 2Q-Anregungszeit von 1 ms) in (c) und (d). Alle Proben wurden mit 5 mm TOTAPOL in $[\text{D}_8]\text{Glycerol}/\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (2:6:2) gewaschen. Signalverstärkungen sind relativ zum Fall ohne Mikrowelleneinstrahlung angegeben.

bung beeinflusst wird.^[3] Weitere detaillierte Strukturuntersuchungen waren aber wegen mangelnder Empfindlichkeit nicht möglich. Für unsere DNP-Studien behandelten wir Liposomen aus Palm1–15 und DMPC/DMPG/Cholesterin/MPLA (9:1:7:0.06 molares Verhältnis) (Abbildung 1 a,c) oder DMTAP/Cholesterin/MPLA (10:7:0.06) (Abbildung 1 b,d) mit dem DNP-Polarisationsreagens TOTAPOL^[7] und $[\text{D}_8]\text{Glycerol}$ (DMPC = 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, DMPG = 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-(phosphorac-(1-glycerol)), DMTAP = 1,2-Dimyristoyl-3-trimethylammoniumpropan). Diese Proben zeigten stark verbesserte NMR-Signale im Fall von eindimensionalen Kreuzpolarisations- und Doppelquanten-gefilterten (2QF-) ^{13}C -fkNMR-Experimenten für beide Lipidzusammenstellungen (Abbildung 1 a-d).

Weitere Experimente legten nahe, dass geringe TOTAPOL-Konzentrationen einen guten Kompromiss zwischen Signalverstärkung und paramagnetischer Relaxation bieten. Damit wurden zweidimensionale (2Q,1Q-)Experimente möglich (Abbildung 2). Wegen der geringen Peptidkonzentration (Peptid/Lipid-Verhältnis 1:200) enthalten die fkNMR-

[*] E. J. Koers, Dr. M. Weingarth, Dr. D. Nand, Prof. Dr. M. Baldus
NMR Spectroscopy, Bijvoet Center for Biomolecular Research
Department of Chemistry, Faculty of Science
Utrecht University
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)
E-Mail: m.baldus@uu.nl

Dr. M. P. López-Deber, Dr. D. T. Hickman, D. Mlaki Ndao,
Dr. P. Reis, A. Granet, Prof. Dr. A. Pfeifer, Dr. A. Muhs
AC Immune SA, PSE-B, EPFL
1015 Lausanne (Schweiz)

[**] M.W. dankt für ein FEBS Long-Term Fellowship. Diese Arbeit wurde unterstützt von NWO (Grant 722.012.022 an M.W. sowie Grants 700.26.121 und 700.10.433 an M.B.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201303374> zu finden.

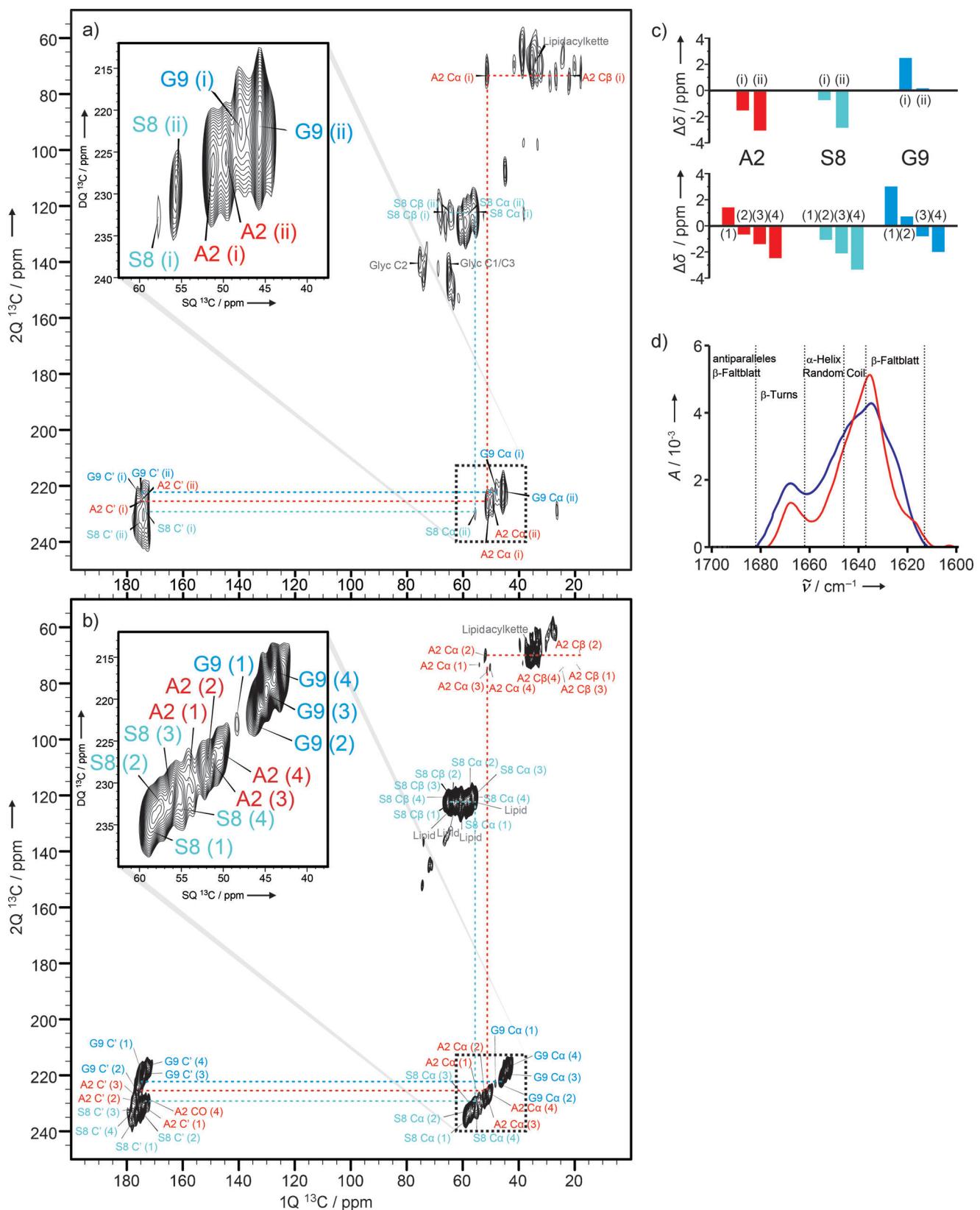


Abbildung 2. ^{13}C -(2Q/1Q)-2D-Experimente an liposomalem Palm1-15. Liposomen bestanden aus a) DMPC/DMPG/Chol oder b) DMTAP/Chol. c) Differenz der Verschiebungen $\Delta\delta = \delta\text{C}\alpha - \delta\text{C}\alpha(\text{rc})$ für liposomalem Palm1-15-Impfstoff in DMPC/DMPG/Chol (oben) und in DMTAP/Chol (unten); d) ATR-IR-Amid-I-Bandenspektren von liposomalem Palm1-15 in anionischem DMPC/DMPG/Chol (rot) und kationischen Liposomen (DMTAP/Chol; blau).

Spektren sowohl Signale der ^{13}C -markierten Peptidreste als auch Korrelationen für die in natürlicher Häufigkeit auftretenden Lipide. Gegenüber den Signalen des markierten Peptids sollten Lipidsignale um einen Faktor 10000 abgeschwächt sein. Dies entspricht einem effektiven Lipid/Peptid-Verhältnis von > 500:1, was den Einsatz konventioneller fkNMR-Methoden deutlich erschwert.^[3]

Das charakteristische Muster der chemischen Verschiebungen ermöglicht eine einfache Unterscheidung von Peptid- und Lipidsignalen. Für die drei markierten Reste (Ala2, Ser8 und Gly9) beobachteten wir zwei Signalsätze für die DMPC/DMPG/Chol-Probe (Abbildung 2a; Chol = Cholesterin). Im Fall von DMTAP/Chol konnten vier fkNMR-Korrelationen identifiziert werden (Abbildung 2b). Wie zuvor gezeigt^[8] berechneten wir im weiteren sekundärchemische Verschiebungen $\Delta\delta$, die etablierte Parameter für die Analyse der Peptidstruktur in flüssiger und fester Phase sind.^[9] In Abbildung 2c sind $\Delta\delta$ -Werte für Ca-Signale für beide Lipidzusammenstellungen wiedergegeben.

Im Fall von DMPC/DMPG/Chol (Abbildung 2c, oben) sind die stärksten Korrelationen (bezeichnet mit ii) für Ala2 und Ser8 deutlich negativ. Dies ist in Einklang mit einer gestreckten Peptidrückgratstruktur, bei der $\Delta\delta$ -Werte für Glycinreste nahe an den Werten eines ungefalteten Peptids liegen,^[10] was in Einklang mit den dominanteren Signalen (ii) in Abbildung 2a ist. Eine zweite schwächere Population (i) zeigte sekundärchemische Verschiebungen, die typisch für eine Random-Coil-Struktur sind. Im Fall des kationischen DMTAP/Chol (Abbildung 2c, unten) beobachteten wir ebenfalls sekundärchemische Verschiebungen, die einer gestreckten Peptidrückgratstruktur entsprechen (Spezies 3 und 4); allerdings waren deren Signalintensitäten vergleichbar zu denen von Signalen, die geringe oder sogar positive $\Delta\delta$ -Werte zeigten und in Abbildung 2b,c mit Population 1 und 2 gekennzeichnet sind. Dabei sollte beachtet werden, dass in Abwesenheit von sequenziellen Zuordnungen die Population X nicht notwendigerweise dieselbe Peptideinheit X darstellt.

ATR-IR-Experimente (Abbildung 2d) bestätigten die Gegenwart zusätzlicher Peptidkonformationen für liposomales Palm1–15. Kurvenanpassungsverfahren sprechen für einen großen β -Faltblattanteil (insgesamt 72 %) im Falle von DMPC/DMPG/Chol (Abbildung 2d, rote Linie) in qualitativer Übereinstimmung mit dem 60:40-Intensitätsverhältnis zwischen den Populationen (ii) und (i) in der fkNMR-Spektroskopie. Wie in unseren früheren Studien^[3] (siehe Abbildung S1 der Hintergrundinformationen) führt die Verwendung von kationischem DMTAP/Chol zu einer signifikanten Reduzierung der β -Faltblattstruktur und zu einem Anstieg von anderen Peptidkonformationen (Abbildung 2d, blaue Linie).

Für weitere Untersuchungen führten wir mesoskopische Coarse-grained-Moleküldynamiksimulationen (CGMD) durch (Abbildung 3). Peptide in wässriger Phase lagerten sich in weniger als einer Mikrosekunde an der Membranoberfläche an. Dort bildeten sich gestreckte Peptidkonformationen im Einklang mit unseren fkNMR-Daten am freien Peptid, die nahelegen, dass β -Faltblattstrukturen an der Membran häufiger auftreten als in wässriger Phase (siehe Abbildung S2 der Hintergrundinformationen).

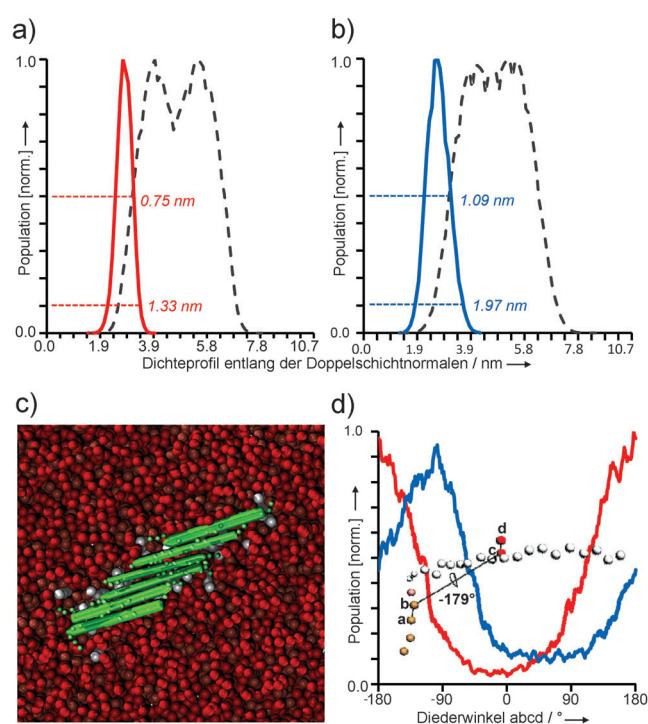


Abbildung 3. Dichteprofil des Peptidrückgrats in einer a) 9:1:7-DMPC/DMPG/Chol- und b) 10:7-DMTAP/Chol-Mischung. Durchgezogene und gestrichelte Linien geben Peptide bzw. das Membranprofil wieder. c) Beispiel eines geordneten hexameren β -Faltblatts von Palm1–15 in DMPC/DMPG/Chol nach 25 μs Simulation. DMPC/DMPG-Lipide und Cholesterin sind in Bw. Dunkelrot wiedergegeben; Palmitoylanker und das Peptidrückgrat sind als graue bzw. grüne Perlen gekennzeichnet. d) Während negativ geladene Seitenketten wie Asp7 sich in DMPC/DMPG/Chol (rot) vorzugsweise entlang der Doppelschichtnormalen orientieren, liegen die Seitenketten in DMTAP/Chol fast parallel zur Oberfläche (blau). Diederwinkel wurden über alle Peptide und über 25 μs der Simulation gemittelt.

Wir beobachteten spontane Peptidaggregation zu β -Faltblatt-artigen Aggregaten in beiden Lipidmischungen. Eine weitere Analyse der oberflächengebundenen Peptide offenbarte ein deutlich breiteres Dichteprofil des Peptidrückgrats in DMTAP/Chol als in DMPC/DMPG/Chol (Abbildung 3a,b). Im Fall von DMPC/DMPG/Chol können sich Peptidrückgrate ohne sterische oder elektrostatische Behinderung (Abbildung 3c) annähern, da negativ geladene Seitenketten hauptsächlich senkrecht zur Membranoberfläche stehen (Abbildung 3d). In kationischen DMTAP-Lipiden liegen die anionischen Seitenketten fast parallel zur Doppelschichtoberfläche. Dies deutet darauf hin, dass die Membranladung das Aggregationsverhalten des Peptids modulieren könnte.^[3] Darüber hinaus könnten die verringerte Dicke und Kopfgruppengröße im Fall der DMTAP-Lipide, die zu einer leicht positiven Krümmung der Peptid-Lipid-Schicht in den Simulationen führen, eine Rolle spielen.

Insgesamt zeigen unsere Resultate, dass DNP-unterstützte fkNMR-Spektroskopie eine wirkungsvolle Methode ist, um Strukturuntersuchungen an Oberflächen-assoziierten Biomolekülen in geringer Konzentration durchzuführen. Im Fall von Palm1–15 belegen unsere Studien, dass der aktive Impfstoff in β -Faltblattumgebungen auftritt, die zumindest

zum Teil durch Peptid-Peptid-Wechselwirkungen bestimmt sind die nach Dimerbildung zur Entstehung von größeren Oligomeren an der Membran führen. Unsere Daten sprechen dafür, dass nur im DMPC/DMPG/Chol-Fall größere β -Faltblätter entstehen und dass zusätzliche Strukturen, die besonders im DMTAP-Fall auftreten, die In-vivo-Zielspezifität reduzieren könnten. Diese Resultate eröffnen neue Möglichkeiten für ein zielgerichtetes, strukturbasiertes Design von liposomgebundenen Peptidimmunogenen mit definierten Konformationen für optimierte Impfstoffe gegen eine Reihe von Proteinfehlfaltungserkrankungen. Zukünftige Studien könnten auch zelluläre Umgebungen, in denen DNP-fkNMR-Experimente möglich sind,^[11] umfassen. Darüber hinaus könnte DNP-unterstützte fkNMR-Spektroskopie generell auch bei der Aufklärung der Rolle von Lipidoberflächen bei der Proteinaggregation, Toxizität und Porenbildung sowie bei der Untersuchung von Intermediaten der Amyloidfaltung behilflich sein.

Experimentelles

Liposomales Palm1–15 wurde wie zuvor gezeigt^[3] hergestellt. Für die NMR-Experimente wurden 666 μL Liposomen durch Zentrifugation auf ein Volumen von etwa 25 μL (100000 g, 1 h) verringert. Das Pellet wurde mit 50 μL einer 5 mm TOTAPOL-Lösung (DyNuPol) in [D₈]Glycerol/D₂O/H₂O (2:6:2) gewaschen. Die Liposomen wurden 1–3 h bei 100000 g pelletiert, und danach wurde der Überstand entfernt; diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Die NMR-Experimente wurden mithilfe eines 400-MHz/263-GHz-DNP-Systems (Bruker Biospin) durchgeführt. Die Probe wurde bei etwa 100 K in einem 3.2-mm-Saphirrotor unter 8-kHz-MAS untersucht. DNP-Verstärkungsfaktoren wurden durch Vergleich von HC-CP/MAS-Spektren mit und ohne Mikrowelleneinstrahlung bestimmt. (2Q/1Q)-Experimente wurden mit der SPC5-Sequenz^[12] mit einer 1-ms-Doppelquantenanregungszeit gemessen. CGMD-Simulationen^[13] wurden für beide Lipidmischungen unter Zuhilfenahme von 18 Palm1–15-Kopien über 25 μs durchgeführt (siehe auch Hintergrundinformationen).

Eingegangen am 21. April 2013,
veränderte Fassung am 24. Juni 2013
Online veröffentlicht am 23. August 2013

Stichwörter: Alzheimer-Erkrankung · Amyloide β -Peptide · Dynamische Kernpolarisation · Liposomale Impfstoffe · NMR-Spektroskopie

- [1] T. M. Allen, P. R. Cullis, *Science* **2004**, *303*, 1818–1822.
- [2] D. S. Watson, A. N. Endsley, L. Huang, *Vaccine* **2012**, *30*, 2256–2272.
- [3] D. T. Hickman, M. P. López-Deber, D. M. Ndao, A. B. Silva, D. Nand, M. Pihlgren, V. Giriens, R. Madani, A. St-Pierre, H. Karastaneva, L. Nagel-Steger, D. Willbold, D. Riesner, C. Nicolau, M. Baldus, A. Pfeifer, A. Muhs, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13966–13976.
- [4] a) C. Ader, R. Schneider, K. Seidel, M. Etzkorn, M. Baldus, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *035*, 991–995; b) B. Bechinger, E. S. Salmikov, *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 282–301.
- [5] a) R. G. Griffin, *Nature* **2010**, *468*, 381–382; b) V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9244–9249; c) A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M. A. Caporini, V. Vitzthum, P. Mieville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Coperet, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15459–15461; d) A. H. Linden, S. Lange, W. T. Franks, Ü. Akbey, E. Specker, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19266–19269; e) L. Reggie, J. J. Lopez, I. Collinson, C. Glaubitz, M. Lorch, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19084–19086; f) E. Salmikov, M. Rosay, S. Pawsey, O. Ouari, P. Tordo, B. Bechinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5940–5941.
- [6] A. Muhs, D. T. Hickman, M. Pihlgren, N. Chuard, V. Giriens, C. Meerschman, I. van der Auwera, F. van Leuven, M. Sugawara, M.-C. Weingertner, B. Bechinger, R. Greferath, N. Kolonko, L. Nagel-Steger, D. Riesner, R. O. Brady, A. Pfeifer, C. Nicolau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9810–9815.
- [7] C. Song, K.-N. Hu, C.-G. Joo, T. M. Swager, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11385–11390.
- [8] S. Luca, J. F. White, A. K. Sohal, D. V. Filippov, J. H. van Boom, R. Grisshammer, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10706–10711.
- [9] a) D. S. Wishart, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171–180; b) S. Luca, D. V. Filippov, J. H. van Boom, H. Oschkinat, H. J. M. de Groot, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 325–331.
- [10] Y. J. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 852–861.
- [11] a) M. Renault, R. Tommassen-van Boxtel, M. P. Bos, J. A. Post, J. Tommassen, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4863–4868; b) M. Renault, S. Pawsey, M. P. Bos, E. J. Koers, D. Nand, R. Tommassen-van Boxtel, M. Rosay, J. Tommassen, W. E. Maas, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3053–3056; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2998–3001.
- [12] M. Hohwy, C. M. Rienstra, C. P. Jaroniec, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 7983–7992.
- [13] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, A. H. de Vries, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7812–7824.